



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO DOS DERIVADOS DA GUANINA COMO AGENTES PROTETORES E**  
**TRÓFICOS EM ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS CEREBELARES.**

**Sheila Regina Schmidt Francisco**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Carla I. Tasca**  
**Departamento de Bioquímica**

**Florianópolis, fevereiro de 2004.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO DOS DERIVADOS DA GUANINA COMO AGENTES  
PROTETORES E TRÓFICOS EM ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS  
CEREBELARES.**

**Sheila Regina Schmidt Francisco**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Carla I. Tasca  
Departamento de Bioquímica**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre.**

**Florianópolis, fevereiro de 2004.**

Este trabalho foi realizado em colaboração com o ***Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto***, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, tendo parte dos procedimentos experimentais sido realizados no Laboratório de Morfogênese Celular, durante estágio financiado pelo Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD/CAPES - Nº 0013/01-3), no desenvolvimento de projeto conjunto intitulado, “Diferenciação Celular, Plasticidade e Proteção Celular no Sistema Nervoso Central”.

*Ao meu marido Pierre.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>ª</sup>. Carla Inês Tasca por ter me aceito sem me conhecer, pela orientação, paciência e por ter aberto muitas portas para mim neste período que passamos juntas.

Aos Prof. Andréa Gonçalves Trentin e Márcio Alvarés-Silva por permitir a realização da parte experimental do meu trabalho em seu Laboratório. Ao Prof. Márcio por ter me indicado para a Prof<sup>ª</sup>. Carla. A Prof<sup>ª</sup>. Andréa pelas conversas e pela ajuda na etapa final da dissertação.

Ao Prof. Vivaldo Moura Neto por ter aberto as portas de seu Laboratório para mim e pela colaboração na realização do meu trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Sônia Gonçalves por ter permitido o uso do espectrofotômetro ao longo da realização do trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Maguerita Barracco e ao Prof. Mário Steindel por terem cedido os microscópios de fluorescência quando precisei.

À Prof<sup>ª</sup>. Flávia Gomes por ter me socorrido nos primeiros dias em que estive no Rio de Janeiro e ajuda com a morfometria de neurônios.

Aos Prof. do Curso de Pós-Graduação em Neurociências.

Ao CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos e da realização da pesquisa.

Ao Biotério Central pelo fornecimento de animais.

Ao secretário da Pós-graduação em Neurociência, Nivaldo por estar sempre pronto para nos atender da melhor forma.

À secretária da Pós-graduação em Morfogênese Celular da UFRJ, Rosângela pela preocupação e apoio durante o período em que passei no Rio.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Celular e Molecular, Tiago, Karina, Dani W., Dani G., Helena, Carla, Simone, Rossana, Maurício, Sandro e Samira pela amizade, companheirismo e força em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Hematologia e Morfologia Celular, Cláudia por ter aberto as portas do Laboratório para mim e pela amizade, Ricardo, Carlos, Evaldo, Pâmela, Meline e Talita pela amizade e companheirismo sempre.

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese Celular da UFRJ, Luciana Romão, por toda a paciência e amizade durante o período em que passei lá, Jane, Rose, Sheila, Tércia e Patrícia pela alegria, amizade e força que me deram.

Ao meu colega Anderson por ter me oferecido abrigo e principalmente pela amizade e força durante estes dois anos. Jamais esquecerei.

À D. Maria, Sr. Hans, Samuel e Dani por terem aberto as portas de sua casa para mim.

Aos meus pais, Werner e Cecília e minha irmã Denise pelas conversas, força, carinho e atenção em todos os momentos.

Ao meu cachorro Max, pela companhia durante a escrita deste trabalho.

Ao meu querido marido Pierre por tudo, apoio, confiança, amor e principalmente pela força nestes dois anos. Sem você eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada por você fazer parte da minha vida.

## SUMÁRIO

|                                                                                        |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                 | i    |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                                                             | vi   |
| RESUMO.....                                                                            | vii  |
| ABSTRACT .....                                                                         | viii |
| 1.0. INTRODUÇÃO.....                                                                   | 01   |
| 1.1. NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS.....                                                       | 01   |
| 1.1.1. Proteínas do citoesqueleto de astrócitos .....                                  | 03   |
| 1.2. INTERAÇÃO NEURÔNIO-GLIA .....                                                     | 03   |
| 1.2.1. Proteínas da Matriz Extracelular (MEC).....                                     | 06   |
| 1.2.1.1. Laminina.....                                                                 | 07   |
| 1.2.1.2. Fibronectina.....                                                             | 08   |
| 1.3. DERIVADOS DA GUANINA.....                                                         | 10   |
| 1.3.1. Efeitos Tróficos dos Nucleotídeos e Nucleosídeos derivados da Guanina (DG)..... | 11   |
| 1.3.2. DG e Transmissão Glutamatérgica.....                                            | 12   |
| 1.4. TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA .....                                                  | 14   |
| 1.5. EXITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA.....                                               | 18   |
| 1.6. MORTE CELULAR .....                                                               | 19   |
| 2.0. OBJETIVOS.....                                                                    | 23   |
| 2.1. OBJETIVO GERAL .....                                                              | 23   |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                       | 23   |
| 3.0. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                          | 24   |
| 3.1. MATERIAIS .....                                                                   | 24   |
| 3.1.1. Reagentes.....                                                                  | 24   |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.2. Equipamentos .....                                                | 25 |
| 3.2. ANIMAIS .....                                                       | 26 |
| 3.3. CULTURAS DE CÉLULAS .....                                           | 26 |
| 3.3.1. Astrócitos.....                                                   | 26 |
| 3.3.2. Neurônios para Co-cultura .....                                   | 26 |
| 3.4. TRATAMENTO DAS CULTURAS.....                                        | 27 |
| 3.4.1. Astrócitos.....                                                   | 27 |
| 3.4.2. Co-culturas .....                                                 | 27 |
| 3.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....                              | 27 |
| 3.5.1. Detecção de Apoptose .....                                        | 27 |
| 3.5.2. Avaliação da morte por necrose com Iodeto de Propídio (PI) .....  | 28 |
| 3.5.3. Avaliação da liberação da enzima Lactato desidrogenase (LDH)..... | 29 |
| 3.6. IMUNOCITOQUÍMICA .....                                              | 29 |
| 3.6.1. Fixação das Células .....                                         | 29 |
| 3.6.2. Imunomarcção da GFAP .....                                        | 29 |
| 3.6.3. Imunomarcção de Fibronectina e Laminina .....                     | 30 |
| 3.6.4. Imunomarcção de $\beta$ -tubulina III .....                       | 30 |
| 3.7. MORFOMETRIA .....                                                   | 30 |
| 3.8. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR .....                             | 31 |
| 3.8.1. Imunocitoquímica anti-BrdU.....                                   | 31 |
| 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                           | 31 |
| 4.0 RESULTADOS .....                                                     | 32 |
| 4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ASTRÓCITOS.....                                  | 32 |
| 4.2. AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR .....                                    | 33 |



|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.1 AVALIAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS APÓS O TRATAMENTO COM GLU, GMP OU GLU E GMP, POR 24 OU 48H .....                                                              | 33 |
| 4.2.2 DETECÇÃO DE MORTE POR APOPTOSE .....                                                                                                                               | 35 |
| 4.2.3 DETECÇÃO DA MORTE POR NECROSE .....                                                                                                                                | 41 |
| 4.2.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR POR CONTRASTE DE FASE .....                                                                                                          | 50 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO DOS ASTRÓCITOS COM GMP OU GUO SOBRE NEURÔNIOS EM CO-CULTURA .....                                                            | 51 |
| 4.3.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO DE ASTRÓCITOS CEREBELARES COM GMP OU GUO, POR 24H, SOBRE O NÚMERO DE NEURÔNIOS EM CO-CULTURA .....                         | 52 |
| 4.3.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO DE ASTRÓCITOS CEREBELARES COM GMP OU GUO, POR 24H, SOBRE O NÚMERO DE NEURITOS POR NEURÔNIOS EM CO-CULTURA.....             | 55 |
| 4.3.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO DE ASTRÓCITOS CEREBELARES COM GMP OU GUO, POR 24H, SOBRE O COMPRIMENTO TOTAL DOS NEURITOS DE NEURÔNIOS EM CO-CULTURA ..... | 58 |
| 4.3.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO DE ASTRÓCITOS CEREBELARES COM GMP OU GUO, POR 24H, SOBRE O COMPRIMENTO DOS NEURITOS POR NEURÔNIOS EM CO-CULTURA.....       | 59 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR .....                                                                                                                              | 62 |
| 4.4.1 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE BROMODEOXIURIDINA (BrdU) EM ASTRÓCITOS TRATADOS COM GMP OU GUO POR 24H.....                                                           | 62 |
| 4.4.2 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE BrdU EM NEURÔNIOS EM CO-CULTURA COM ASTRÓCITOS PRÉ-TRATADOS COM GMP OU GUO POR 24H .....                                              | 64 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS APÓS TRATAMENTO COM GMP OU GUO .....                                                                                          | 66 |
| 4.6.ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) .....                                                                                                         | 68 |
| 4.6.1. Fibronectina.....                                                                                                                                                 | 68 |

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6.2. Laminina.....                                                                                | 72 |
| 5.0. DISCUSSÃO .....                                                                                | 75 |
| 5.1. CARACTERIZAÇÃO E MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS .....                                               | 75 |
| 5.2. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR.....                                                                | 75 |
| 5.3.AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DOS ASTRÓCITOS COM GMP OU GUO SOBRE<br>NEURÔNIOS EM CO-CULTURA..... | 78 |
| 6.0. CONCLUSÕES .....                                                                               | 83 |
| 7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                               | 84 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Representação da organização da MEC.....                                                                                                     | 07 |
| Figura 2: Estrutura da Laminina.....                                                                                                                   | 08 |
| Figura 3: Estrutura da Fibronectina.....                                                                                                               | 09 |
| Figura 4: Representação esquemática da transmissão glutamatérgica.....                                                                                 | 17 |
| Figura 5: Esquema representativo da ativação da via intrínseca na morte celular apoptótica.....                                                        | 20 |
| Figura 6: Imagem representativa de microscopia de fluorescência de um núcleo picnótico e um núcleo normal de astrócitos corados com HOESCHT 33342..... | 28 |
| Figura 7: Caracterização dos astrócitos cerebelares de ratos neonatos marcados para GFAP.....                                                          | 32 |
| Figura 8: Efeitos do Glu e do GMP sobre o número de astrócitos em cultura.....                                                                         | 34 |
| Figura 9: Efeito do Glu e do tempo de incubação na indução de apoptose em astrócitos em cultura.....                                                   | 36 |
| Figura 10: Efeito das diferentes concentrações de GMP e do tempo de incubação na indução de apoptose em astrócitos em cultura.....                     | 37 |
| Figura 11: Imagens de microscopia de fluorescência de astrócitos corados com HOESCHT 33342 após 24h de exposição ao Glu e ao GMP.....                  | 38 |
| Figura 12: Imagens de microscopia de fluorescência de astrócitos corados com HOESCHT 33342 após 48h de exposição ao Glu e ao GMP.....                  | 39 |
| Figura 13: Efeitos do Glu e do GMP na indução de apoptose em astrócitos em cultura.....                                                                | 40 |
| Figura 14: Efeitos do Glu e do tempo de incubação na indução de necrose em astrócitos em cultura.....                                                  | 42 |
| Figura 15: Efeitos do Glu e do tempo de incubação na liberação de LDH em astrócitos em cultura.....                                                    | 43 |

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16: Efeito das diferentes concentrações de GMP e do tempo de incubação na indução de necrose em astrócitos em cultura .....                 | 44 |
| Figura 17: Efeitos do GMP na liberação de LDH em astrócitos em cultura .....                                                                       | 45 |
| Figura 18: Imagens de microscopia de fluorescência de astrócitos corados com Iodeto de propídio após 24h de exposição ao Glu e ao GMP .....        | 46 |
| Figura 19: Imagens de microscopia de fluorescência de astrócitos corados com Iodeto de propídio após 48h de exposição ao Glu e ao GMP .....        | 47 |
| Figura 20: Efeitos do Glu e do GMP na indução de necrose em astrócitos em cultura .....                                                            | 48 |
| Figura 21: Efeitos do Glu e do GMP na liberação de LDH em astrócitos em cultura .....                                                              | 49 |
| Figura 22: Fotomicrografias representativas de contraste de fase de astrócitos em cultura tratados com Glu e GMP .....                             | 50 |
| Figura 23: Fotos representativas do efeito do pré-tratamento de astrócitos com GMP sobre o número de neurônios co-cultivados por 24h .....         | 52 |
| Figura 24: Fotos representativas do efeito do pré-tratamento de astrócitos com GUO sobre o número de neurônios co-cultivados por 24h .....         | 53 |
| Figura 25: Número de neurônios observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO por 24h .....                         | 54 |
| Figura 26: Número de neuritos por neurônio observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GMP por 24h .....                    | 56 |
| Figura 27: Número de neuritos por neurônio observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GUO por 24h .....                    | 57 |
| Figura 28: Comprimento total dos neuritos de neurônios observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO por 24h ..... | 58 |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 29: Distribuição dos neurônios por comprimento dos neuritos observado após 24h de co-cultura com astrócitos pré-tratados com GMP .....   | 60 |
| Figura 30: Distribuição dos neurônios por comprimento dos neuritos observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GUO. .... | 61 |
| Figura 31: Efeitos do tratamento de astrócitos com GMP ou GUO, por 24h, na proliferação astrocitária .....                                      | 63 |
| Figura 32: Efeitos do pré-tratamento de astrócitos com GMP ou GUO, por 24h, na proliferação de neurônios mantidos em co-cultura .....           | 65 |
| Figura 33: Efeitos do tratamento de astrócitos com GMP ou GUO, por 24h, na marcação da GFAP .....                                               | 67 |
| Figura 34: Efeitos do tratamento de astrócitos com GMP por 24h, sobre a organização da fibronectina.....                                        | 69 |
| Figura 35: Efeitos do tratamento de astrócitos com GUO por 24h, sobre a organização da fibronectina.....                                        | 70 |
| Figura 36: Fotografias representativas das alterações na organização de fibronectina em astrócitos tratados com GMP ou GUO por 24h.....         | 71 |
| Figura 37: Efeitos do tratamento de astrócitos com GMP por 24h, sobre a organização da laminina .....                                           | 73 |
| Figura 38: Efeitos do tratamento de astrócitos com GUO por 24h, sobre a organização da laminina .....                                           | 74 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADO** – Adenosina

**AMPA** – Alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato

**AMPc** – 5'-adenosina monofosfato cíclico

**ANOVA** – Análise de variância de uma via

**APS** – Persulfato de amônia

**ATP** – 5'-adenosina trifosfato

**Bcl-2** – linfoma 2 de células B

**BDNF** – Fator de crescimento derivado do encéfalo

**BrdU** – Bromodeoxiuridina

**BSA** – Albumina sérica bovina

**Cy3** – anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à rodamina

**DG** – Nucleotídeos e nucleosídeo derivados da guanina

**DMEM-F12** – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

**EGF** – Fator de crescimento epidérmico

**FBS** – Soro fetal bovino

**FGF** – Fator de crescimento fibroblático

**FITC** – Isotiocianato de fluoresceína

**FN** – Fibronectina

**GDP** – 5'-guanosina-difosfato

**GMP** – 5'-guanosina-monofosfato

**GFAP** – Proteína glial fibrilar ácida

**GLAST** – transportador astrocitário de glutamato e aspartato

**GLT-1** – transportador astrocitário de glutamato-1

**Glu** – Glutamato

**GluRs** – Receptores de glutamato

**GppNHp** – 5'-guanilil-imido-difosfato

**GTP** – 5'-guanosina-trifosfato

**GUO** – Guanosina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**HEPES** – Ácido hidroxil-etil-piperazina-etanosulfônico

**IgG** – Imunoglobulina

**KA** – Kainato

**LDH** – Lactato desidrogenase

**LN** – Laminina

**MEC** – Matriz extracelular

**NFκB** – Fator nuclear κB

**NGF** – Fator de crescimento neuronal

**NGS** – Soro normal de cabra

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**NT-3** – Neurotrofia-3

**NT-4/5** – Neurotrofina-4/5

**PBS** – Solução salina tamponada por fosfato

**PC12** – linhagem celular Pheocromocitoma 12

**PF** - Paraformaldeído

**PGs** – Proteoglicanos

**PI** – Iodeto de propídio

**SNC** – Sistema nervoso central

**T<sub>3</sub>** – Hormônio da tireóide

**TGF** – Fator de crescimento de transformação



## RESUMO

Os nucleotídeos e o nucleosídeo derivados da guanina (DG) têm sido implicados em diversas funções extracelulares importantes, como a modulação da transmissão glutamatérgica e efeitos tróficos em neurônios e astrócitos. O glutamato (Glu) é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso de mamíferos e a ativação de seus receptores tem importante papel em processos fisiológicos e patológicos. O objetivo deste estudo foi analisar o possível papel neuroprotetor e/ou neurotrófico dos DG em culturas de astrócitos submetidas a incubações com glutamato e em co-culturas com neurônios granulares cerebelares. Glu (1 mM ou 10 mM) não induziu apoptose em astrócitos cerebelares após 24h ou 48h de incubação, porém 10 mM de Glu induziu necrose após 48h de tratamento. GMP (1 mM) não induziu necrose ou apoptose e também não protegeu os astrócitos contra a necrose induzida pelo glutamato. Em astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO (guanosina; 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM) por 24h e co-cultivados com neurônios cerebelares, observou-se um aumento significativo no número de neurônios em cultura após 24h. Entretanto, não se observou alteração no número de neuritos por neurônio ou no comprimento dos neuritos. GMP e GUO não induziram proliferação de astrócitos ou neurônios. GMP ou GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM) promoveram alterações na organização das proteínas da matriz extracelular (MEC), laminina e fibronectina, da forma puntual (no controle) para a forma fibrilar. Estes resultados demonstram que Glu (10 mM) induz necrose em astrócitos cerebelares após 48h de tratamento e que GMP (1 mM) não protege estas células da toxicidade induzida pelo glutamato. Entretanto, os DG (GUO e GMP) alteram a organização das proteínas da MEC, laminina e fibronectina, aumentando assim, a sobrevivência de neurônios cerebelares co-cultivados com astrócitos.

## ABSTRACT

Guanine derivatives (GD) have been implicated in diverse important extracellular functions, such as modulation of glutamatergic transmission and trophic effects on neurons and astrocytes. Glutamate (Glu) is the main excitatory neurotransmitter in mammalian nervous system and its receptors activation exerts important roles in physiological and pathological processes. The aim of this study was to investigate the putative neuroprotective or neurotrophic role of GD in astrocyte cultures submitted to glutamate and in cerebellar neuron-astrocyte cocultures. Glu (1 mM or 10 mM) did not induced apoptosis in cerebellar astrocytes after 24h or 48h, however 10 mM Glu induced necrosis after 48h of treatment. GMP (1 mM) did not induced necrosis or apoptosis or neither protect astrocytes against glutamate-induced necrosis. A significant increase in the number of cerebellar neurons in coculture was observed after the treatment of astrocytes with GMP or GUO (guanosine; 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M or 1 mM) for 24h. However, through evaluating neurite outgrowth, no alterations in the number of neurites per neuron or in neurite length were observed. GMP or GUO did not induce proliferation of neurons or astrocytes. GMP and GUO altered the organization of the extracellular matrix (ECM) proteins, laminin and fibronectin, from a punctual (in the control cultures) to a fibrilar organization. These results demonstrate that Glu (10 mM) induces necrosis in cerebellar astrocytes after 48h of treatment and GMP (1 mM) does not protect astrocytes against glutamate-induced toxicity. However, GD (GUO and GMP) alter the organization of the ECM proteins, laminin and fibronectin, increasing the number of cerebellar neurons cocultured with astrocytes.

## 1.0. INTRODUÇÃO

### 1.1. NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS:

O termo neuroglia foi descrito pela primeira vez pelo patologista alemão Rudolf Virchow, em 1846. Virchow descreveu a neuroglia como um tecido que ocupa regiões entre os neurônios, sendo semelhante aos tecidos conectivos de outros organismos. Ainda no Século XIX, o citologista italiano Camilo Golgi, desenvolveu técnicas de coloração baseadas na impregnação metálica, que possibilitaram a descoberta de classes distintas de células não neuronais. Mas foram Santiago Ramón y Cajal e Pio del Río Hortega que desenvolveram, utilizando as técnicas de Golgi, um sistema de classificação das células gliais que persiste até hoje (KIMELBERG & NOREMBERG, 1989; RAKIL, 2003).

Neste sistema, a maior parte das células da neuroglia é classificada como macroglia e uma minoria é chamada de microglia. A macroglia é subdividida em astrócitos e oligodendrócitos. Os oligodendrócitos são conhecidos por formar a bainha de mielina que envolve o axônio dos neurônios. Os astrócitos aparecem em duas formas principais: fibrosa e protoplasmática. Astrócitos fibrosos são encontrados na substância branca e seus processos apresentam-se em forma de longas fibras, os astrócitos protoplasmáticos são encontrados na substância cinzenta do Sistema Nervoso Central (SNC) e apresentam-se na forma estrelada. Apesar dos astrócitos diferirem anatomicamente, as diferenças funcionais entre eles não são bem conhecidas (KIMELBERG & NOREMBERG, 1989; RAKIC, 2003).

Os astrócitos estão presentes, juntamente com os neurônios, desde os primeiros estágios de desenvolvimento do SNC. Como células da glia radial constituem o melhor substrato para a migração dos neurônios (RAKIC, 1971). Após o desenvolvimento, suas

principais funções são manter a homeostase neuronal, como equilíbrio iônico, através do tamponamento de potássio, e suprimento energético (DRINGEN & HAMPRECHT, 1992). Os astrócitos são ainda responsáveis pela regulação dos níveis de alguns neurotransmissores na fenda sináptica. Diversos trabalhos demonstram a presença de transportadores para glutamato na membrana de astrócitos (GEGELASHVILI & SCHOUSBOE, 1997; STANIMIROVIC et al., 1999; CONTI & WEINBERG, 1999). Uma vez captado, o glutamato é amidado à glutamina pela enzima glutamina sintetase, uma enzima essencial para o metabolismo do glutamato que está presente especificamente nos astrócitos (MEAROW et al., 1990).

Os neurônios são diferenciados das células neurogliais por seus processos polarizados especializados, os axônios e dendritos, os quais propagam potenciais de ação, formam junções sinápticas com outros neurônios e outros tipos celulares e formam sítios de liberação de neurotransmissores. Ao mesmo tempo, os neurônios possuem receptores para neurotransmissores, os quais estão arranjados em padrões específicos nos dendritos, corpo celular e axônio (OLIET et al., 2001; ROWITCH et al., 2002).

Neurônios e astrócitos possuem algumas propriedades em comum, além da origem comum, o ectoderma, ambos possuem núcleo relativamente grande para o volume do pericário, são capazes de liberar neurotransmissores e expressam proteínas receptoras para neurotransmissores na superfície de suas membranas (VERKHRATSKY & STEINHAUSER, 2000).

Os astrócitos aparecem muito precocemente no SNC em desenvolvimento e uma variedade de formas gliais emerge através da proliferação de células precursoras e progenitoras. Enquanto os neurônios são gerados nas zonas proliferativas, geralmente na superfície ventricular, os astrócitos são gerados em todas as camadas do encéfalo embrionário (LEVITT & RAKIC, 1980; RAFF et al., 1983).

### **1.1.1. Proteínas do citoesqueleto de astrócitos:**

Um importante passo para o entendimento das funções dos astrócitos ocorreu no início da década de 1970, com a descoberta da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). A GFAP é a maior proteína de filamentos intermediários encontrada no citoplasma de astrócitos e é um marcador de diferenciação astrocitária (ENG, 1985; KIMELBERG & NORENBURG, 1985; LEFRANÇOIS et al., 1997; MENET, et al., 2001). Além da GFAP, os astrócitos expressam outros dois tipos de filamentos intermediários: vimentina e nestina. A nestina e a vimentina são as principais proteínas expressas em astrócitos imaturos, enquanto astrócitos em processo de diferenciação ou diferenciados expressam vimentina e GFAP, que formam polímeros entre si (CLARKE & ALLAN, 2002; ENG, 1994).

O envolvimento da GFAP na formação de processos astrocitários foi demonstrado através da inibição da expressão de GFAP (WEINSTEIN et al. 1991). Vários trabalhos têm sugerido o envolvimento da GFAP na manutenção da arquitetura cerebral (LIEDTKE et al., 1996) e na modulação de funções neuronais por astrócitos (PEKNY et al, 1998).

### **1.2. INTERAÇÃO NEURÔNIO-GLIA:**

Durante o desenvolvimento do SNC de mamíferos, os astrócitos constituem o melhor substrato para a migração neuronal e o crescimento de axônios (RAKIC, 2003). LEFRANÇOIS et al. (1997), demonstraram que a inibição da síntese da GFAP, que leva à redução da hipertrofia astrogliar, reverte o bloqueio do crescimento neurítico normalmente observado após uma lesão. MENET et al. (2001), observaram que a inativação da GFAP, mas não da vimentina, aumenta a sobrevivência neuronal e o crescimento de neuritos através do

aumento da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e de moléculas de adesão. Este fenótipo parece ser o mesmo observado em astrócitos imaturos, nos quais a vimentina é rapidamente detectada, mas a GFAP não, e onde os astrócitos são ótimos suportes para o crescimento axonal e migração neuronal (MENET et al., 2001; PRIVAT, 2003).

As interações entre neurônios e astrócitos podem ocorrer através da liberação de fatores solúveis, moléculas de sinalização celular e neurotransmissores, ou através de junções celulares do tipo “gap” (HAYDON, 2000; BARRES & BRADE, 2000). As junções do tipo “gap” podem regular o estabelecimento de conexões químicas e elétricas que por sua vez podem ser utilizadas para comunicações relativamente rápidas entre glia e neurônio (HAYDON, 2000).

Os astrócitos atuam na manutenção de um ambiente propício para os neurônios, através do tamponamento do potássio extracelular, que é aumentado pela atividade neuronal (KIMELBERG & NOREMBERG, 1989) e da recaptação de neurotransmissores da fenda sináptica (NEDERGAARD et al., 2002).

Além disso, vários trabalhos têm demonstrado uma correlação entre o desenvolvimento glial e a sinaptogênese, sugerindo o envolvimento de astrócitos na formação das sinapses. No SNC de ratos, os neurônios formam suas sinapses durante a terceira semana pós-natal, depois da diferenciação dos astrócitos estar completa (PARNAVELAS et al., 1983). Tem sido proposto que fatores solúveis derivados da glia ou de neurônios (neurotrofinas) são necessários para a maturação das sinapses no desenvolvimento *in vitro*, além de apresentarem um papel crucial no controle do número de neurônios e no crescimento de neuritos (BIBEL & BARDE, 2000; PFRIEGER & BARRES, 1997).

As neurotrofinas, sintetizadas e liberadas por neurônios, têm sua síntese e secreção dependente da atividade neuronal (THOENEN, 1995). A primeira neurotrofina identificada

foi o fator de crescimento neuronal (NGF) (LEVI-MONTALCINI, 1966), seguida pelo fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT4/5) (VICÁRIO-ABEJÓN et al., 2002). As neurotrofinas atuam unindo-se a duas classes distintas de receptores transmembrana, os receptores com atividade de tirosina quinase, traduzindo sinais de sobrevivência celular, ou o receptor para neurotrofinas p75, traduzindo sinais de morte celular (KAPLAN & MILLER, 2000).

Vários trabalhos têm demonstrado que não só as neurotrofinas, mas também a proteína S100 $\beta$ , o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento de transformação (TGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), potencialmente secretados pelos astrócitos, apresentam um papel importante na neurogênese (KUHN et al., 1997; KANE et al., 1996) e na neuritogênese (MATINEZ & GOMES, 2002).

A proteína S100 $\beta$ , membro da família S100 de proteínas ácidas e ligantes de cálcio, é amplamente expressa no cérebro e é conhecida por promover sobrevivência e diferenciação neuronal através do aumento de cálcio intracelular, regulando a fosforilação de proteínas alvo e a atividade enzimática, translocação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e aumentando a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (ROTHERMUNDT et al., 2003; HUTTUNEN et al., 2000; ALEXANIAN & BAMBURG, 1999; CASTETS et al., 1997).

Os efeitos da S100 $\beta$  dependem da sua concentração extracelular local. Concentrações nanomolares parecem exercer efeitos neuroprotetores, aumentando a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento (UEDA et al., 1995; BHATTACHARYYA et al., 1992; WHITAKER-AZMITIA et al., 1990) e estimulando o crescimento neurítico (VAN ELAIK et al., 1991; WINNIGHAM-MAJOR et al., 1989); e concentrações micromolares de S100 $\beta$  produzem efeitos neurodegenerativos através da indução do RNA mensageiro e expressão da proteína precursora da  $\beta$ -amilóide (LI et al., 1998).

O EGF e o FGF são mitógenos potentes para progenitores neurais multipotenciais implicados em vários aspectos da neurogênese (CAMERON et al., 1998). GOMES et al. (1999), demonstraram que o TGF $\beta$  e o EGF secretados por astrócitos cerebelares em cultura em resposta ao hormônio da tireóide, T<sub>3</sub>, são capazes de modular a proliferação celular. Além disso, astrócitos tratados com T<sub>3</sub> induzem neuritogênese através do aumento de EGF e FGF e do envolvimento da MEC (MARTINEZ & GOMES, 2002; TRENTIN et al., 2003).

### **1.2.1. Proteínas da Matriz Extracelular (MEC):**

A MEC corresponde a um complexo multifuncional de proteínas e proteoglicanos (PGs), produzido pelas próprias células e altamente organizado para proporcionar a integridade estrutural e servindo de substrato para adesão da maioria das células em organismos vivos (VENSTRON & REICHARDT, 1993). O reconhecimento dinâmico entre as células e a MEC, assim como a mobilização de diversos fatores de crescimento por remodelação da MEC, resultam em transdução de sinal, regulação da expressão gênica e modificação de processos celulares como diferenciação, proliferação adesão e migração celular (PESHEVA & PROBSTMEIER, 2000; STREULI, 1999; SECHELER & SCHWARZBAUER, 1998).

Os efeitos da MEC nos processos celulares são mediados por receptores transmembrana heteroméricos chamados integrinas. As integrinas traduzem o sinal extracelular para o citoplasma da célula envolvendo mudanças no citoesqueleto bem como em proteínas GTPases e quinases (KUCHENBAUER et al., 2001; SCHWARTZ, 2001).

Muitos dos componentes da MEC foram descobertos em tecidos não-neurais e incluem a fibronectina (FN), laminina (LN), vitronectina, colágenos, PGs, tenascina e



trombospondina, porém grande parte destes está expressa no SNC (LETOUNEAU et al., 1994). A laminina e a fibronectina, que são expressas no SNC e exercem importante papel na interação neurônio-astrocítico, serão abordadas neste estudo.

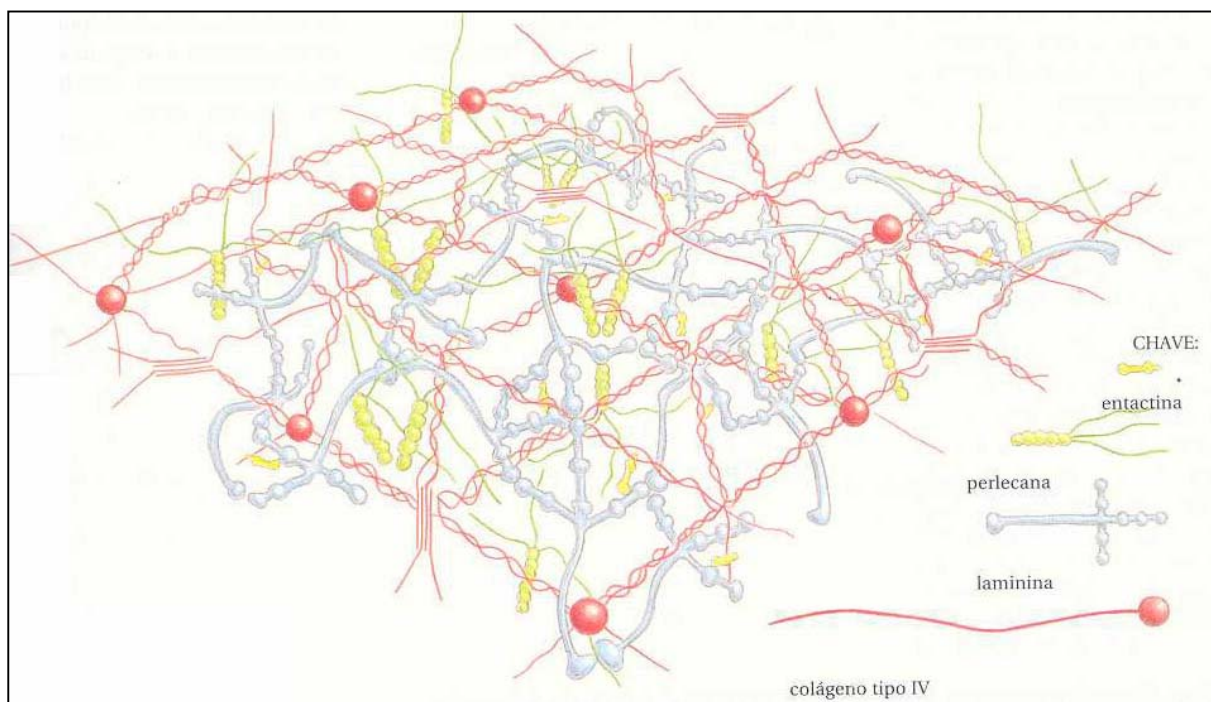


Figura 1: **Representação da organização da MEC.** Entactina, perlecana, colágeno tipo IV e laminina são proteínas da MEC. ALBERTS et al. (2002).

#### 1.2.1.1. Laminina:

Depois dos colágenos, a laminina é o maior componente da MEC. A LN é uma glicoproteína de aproximadamente 70 nm de comprimento, formada por uma cadeia  $\alpha$  de 400 KDa e por duas cadeias  $\beta$  ( $\beta 1$  e  $\beta 2$ ), de aproximadamente 215 KDa e 205 KDa, respectivamente. A LN é sintetizada e secretada pelos astrócitos, depositada nos espaços extracelulares e fixada na superfície celular através da ligação das integrinas (FARWELL et

al., 1995; HYNES, 1987). A regionalização das moléculas de LN na MEC é determinada pelos contatos focais, que são complexos macromoleculares formados pelo agrupamento de integrinas ligadas a microfilamentos de actina (FARWELL et al., 1995; REICHARDT & TOMASELLI, 1991).

Além de fornecer substrato adesivo para as células, a LN promove ótimas condições para o crescimento de neuritos, estando sozinha ou associada com o proteoglicano sulfato de heparana. No sistema nervoso em desenvolvimento a LN é encontrada ao longo das rotas de migração dos neuroblastos e ao longo dos tratos de fibras em crescimento (LUCKENBILL-EDDS, 1997; LIESI et al., 1995; LETOURNEAU et al., 1988).

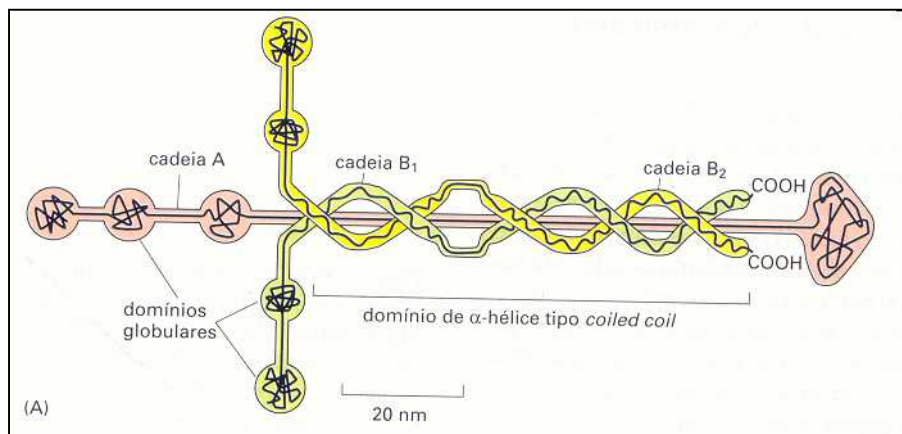


Figura 2: **Estrutura da Laminina.** ALBERTS et al. (2002).

#### 1.2.1.2. Fibronectina:

A fibronectina é uma glicoproteína multifuncional encontrada na MEC, composta de duas subunidades unidas por pontes dissulfeto, próximas às extremidades C-terminal. Apresenta domínios específicos para ligação com outras proteínas de matriz, para

glicosaminoglicanos e para integrinas (ZAGRIS, 2001). A organização da FN na MEC pode mediar adesão celular, afetar a morfologia, migração e diferenciação celular no SNC e diminuir a velocidade do cone de crescimento neuronal (KUHN et al., 1995; STEWART & PEARLMAN, 1987).

Diversos estudos têm demonstrado que a associação de fatores de crescimento e FN pode regular a diferenciação (SERINI et al., 1998) e migração celular (NAGEL & WINKLBAUER, 1999) e que sinais intracelulares podem ser transmitidos para a rede de FN da matriz através das integrinas (WU et al., 1998).

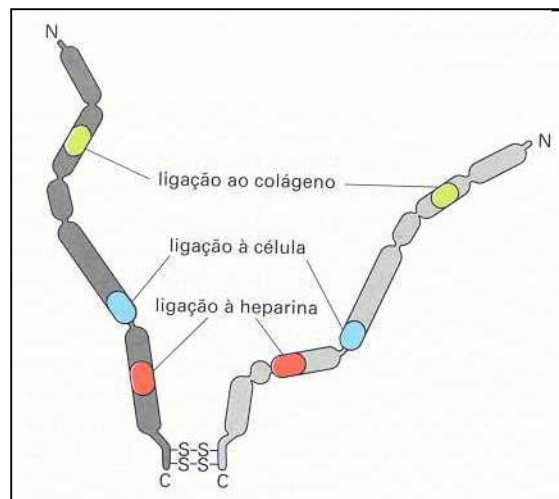


Figura 3: **Estrutura da Fibronectina.** ALBERTS et al. (2002).

### 1.3. DERIVADOS DA GUANINA:

Os nucleotídeos da guanina têm sido implicados em numerosas funções intracelulares, como na síntese de proteínas, na sinalização transmembrana, translocação de proteínas no retículo endoplasmático, diferenciação e proliferação celular e controle do movimento vesicular nas células (BOURNE et al., 1990).

Os nucleotídeos, 5'-guanosina-trifosfato (GTP) e 5'-guanosina-difosfato (GDP), apresentam um papel intracelular essencial no ciclo de ativação/inativação das proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina, tanto heterotriméricas como monoméricas, comumente chamadas de proteínas-G ou GTPases de baixo peso molecular, respectivamente. Estas proteínas com atividade GTPásica realizam a transdução do sinal extracelular em respostas celulares específicas, sendo sua ativação e a conseqüente modulação de proteínas efetoras dependente da troca do GDP pelo GTP intracelular, formando um complexo proteína-G/GTP, que diminui a afinidade dos receptores acoplados aos seus neurotransmissores específicos e modulam a atividade de efetores específicos. Uma atividade GTPásica intrínseca às proteínas-G promove a hidrólise do GTP a GDP, levando a proteína-G ao seu estado inativo. Não foi demonstrada até então nenhuma interação de 5'-guanosina-monofosfato (GMP) e do nucleosídeo guanosina (GUO) com as proteínas-G (EXTON, 1998; MORRIS & MALBON, 1999).

Diversas evidências têm demonstrado um importante papel extracelular desempenhado pelos nucleotídeos e nucleosídeo derivados da guanina (DG), como moléculas de sinalização intercelular e na modulação da transmissão glutamatérgica.

### **1.3.1. Efeitos tróficos dos nucleotídeos e nucleosídeo derivados da guanina (DG):**

Quando agindo extracelularmente, os DG apresentam efeitos tróficos tanto em células gliais quanto em neurônios hipocâmpais em cultura (RATHBONE et al., 1999). Foi demonstrado que estes compostos podem exercer seus efeitos tróficos indiretamente através do aumento na produção de neurotrofinas, como o NGF e a NT-3 e pleiotrofinas, como o FGF ou a proteína S100 $\beta$  em culturas de astrócitos (CICCARELLI et al., 2001).

CICCARELLI et al. (2000) demonstraram que os efeitos mitogênicos exercidos pela GUO exógena em astrócitos corticais de ratos, são mediados por mecanismos envolvendo adenosina (ADO) e fatores solúveis derivados da microglia. Porém, muitos efeitos da GUO não são bloqueados pela adição de antagonistas de receptores de adenosina em células PC12 (GYSBERS & RATHBONE, 1992). Além disso, estudos realizados com astroblastos de pintos demonstraram que GUO e seus nucleotídeos estimulam a proliferação celular (KIM et al., 1991)

Em células PC12, observou-se que o GTP aumenta moderada e constantemente o influxo de cálcio, através da ativação de canais de cálcio do tipo-L (dependentes de voltagem) e liberação de cálcio das vesículas intracelulares, levando a efeitos neuritogênicos nestas células (GYSBERS et al., 2000).

Além disso, neurônios hipocâmpais de camundongos embrionários respondem ao GTP e à GUO de maneira dependente de concentração. Estes DG promovem aumento da arborização e crescimento de neuritos quando os neurônios são co-cultivados com astrócitos (RATHBONE & JUURLINK, 1993).

Os astrócitos são a principal fonte de purinas no SNC. Em condições fisiológicas, os astrócitos podem liberar tanto os derivados da adenina (adenosina e ATP), quanto os derivados da guanina (GUO e GTP). Sob condições de hipóxia/isquemia, as células astrocitárias podem liberar até três vezes mais GUO que em condições normais, e a concentração desta purina pode permanecer elevada por até 30 minutos (CICCARELLI et al, 1999). A presença de DG no líquido cefalorraquidiano de humanos, ou seja, no espaço extracelular, já foi demonstrada (REGNER et al., 1997).

Apesar dos efeitos biológicos dos nucleosídeo e nucleotídeos derivados da guanina estarem bem estabelecidos, poucas evidências demonstram a existência de receptores para estes compostos. Observou-se que GTP une-se a sítios específicos em membranas cerebelares de pintos, sítios estes que não apresentam atividade enzimática (GTPásica) (TASCA et al., 1999a) e dados recentes sugerem a possível existência de sítios de ligação para GTP em células PC12 (GYSBERS et al., 2000) e para a GUO em preparações de membrana de cérebro de ratos (TRAVERSA et al., 2002). Portanto, o(s) sítio(s) de interação e o(s) mecanismo(s) de ação específicos dos DG ainda não são bem conhecidos.

### **1.3.2. DG e transmissão glutamatérgica:**

Tem sido demonstrado que os DG interferem com a união de glutamato a seus receptores e em respostas celulares e na excitotoxicidade promovida por glutamato. Vários estudos demonstraram que GMP, GDP e GTP podem inibir a união de L-[<sup>3</sup>H] glutamato e agonistas ionotrópicos (N-metil-D-aspartato - NMDA, alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato - AMPA e kainato - KA) a seus receptores, sem interagirem com as proteínas-G (MONAHAN et al., 1988; SOUZA & RAMÍREZ, 1991; PAZ et al., 1994; PAAS et al., 1996;

DEV et al., 1996, TASCA et al., 1999a; BURGOS et al., 1998). PORCIÚNCULA et al. (2002), demonstraram que GUO, GMP e GppNHp (análogo pouco hidrolisável do GTP) inibem a união de glutamato e AMPA em preparações de membranas pós-sinápticas de córtex cerebral de ratos.

Utilizando-se fatias de hipocampo de ratos, foi demonstrado que os DG inibem a fosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP)(TASCA et al., 1995) e o acúmulo de AMP cíclico induzido por glutamato e análogos metabotrópicos (TASCA et al., 1998). Também se observou que os DG potencializam o acúmulo de AMP cíclico induzido por adenosina em fatias de hipocampo de ratos jovens e fatias de tectum óptico de pintos (TASCA et al., 1999b; TASCA & SOUZA, 2000).

Estudos avaliando a neurotoxicidade induzida por glutamato *in vivo* demonstraram que os DG administrados via intraperitoneal, intracerebroventricular (MALCON et al., 1997; SCHMIDT et al., 2000) ou via oral (LARA et al., 2001) protegem contra a lesão neuronal e contra convulsões induzidas pela injeção de ácido quinolínico (agonista do receptor NMDA) e que o GMP reverte o efeito de glutamato em respostas comportamentais como a esquia inibitória (RUBIN et al., 1996; RUBIN et al., 1997). Em estudos utilizando modelos de excitotoxicidade *in vitro*, foi observado que os DG protegem contra a toxicidade em um modelo de hipóxia (REGNER et al., 1998) e previnem a toxicidade produzida por glutamato em modelos de isquemia química (MOLZ et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

Assim, vários trabalhos têm sido realizados com a finalidade de elucidar os mecanismos de proteção dos DG contra a toxicidade induzida pelo glutamato.

Em relação ao transporte de glutamato por astrócitos, demonstrou-se que GUO aumenta a recaptação de glutamato em culturas de astrócitos corticais, promovendo uma diminuição na sua concentração extracelular, o que sugere um outro mecanismo para sua

ação protetora contra a excitotoxicidade. Este efeito não é inibido pela administração de um inibidor do transporte de nucleosídeo ou por antagonistas de receptores de adenosina, sugerindo um sítio de ação extracelular sem o envolvimento de receptores de adenosina (FRIZZO et al., 2001).

#### **1.4. TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA:**

O neurotransmissor glutamato é considerado o principal mediador de sinais excitatórios do SNC de mamíferos e estando envolvido em muitos aspectos funcionais do cérebro, tais como: cognição, aprendizagem, memória e controle motor (FONNUM, 1984; COLLINGRIDGE & LESTER, 1989; MICHAELIS, 1998; SEGOVIA et al., 2001).

O metabolismo celular do glutamato envolve tanto neurônios quanto astrócitos. Nos neurônios, o glutamato é transportado para o interior de vesículas sinápticas por um carreador de baixa afinidade através de um mecanismo dependente de gradiente próton-eletroquímico promovido por uma ATPase (NAITO & UEDA, 1985) e subsequentemente liberado após um estímulo de despolarização promovido pela entrada de íons cálcio, que promove a exocitose. Quando o glutamato é liberado para a fenda sináptica, ele interage com seus receptores específicos localizados principalmente na membrana dos terminais pós-sinápticos e de astrócitos.

Como parece não haver nenhuma enzima extracelular capaz de metabolizar o glutamato liberado nos terminais sinápticos, a única maneira rápida e eficaz de promover a sua retirada do fluido extracelular é através da recaptação feita por carreadores de alta afinidade para o glutamato. Estes carreadores estão localizados nos neurônios e principalmente nas células gliais e são dependentes de íons sódio (ROBINSON & DOWD,



1997). Uma eficiente captação de glutamato, suplementada por um processo de difusão passiva para fora da fenda sináptica (ISAACSON & NICOLL, 1993), contribui para o término das ações do glutamato em seus receptores sinápticos.

Nos astrócitos, o glutamato recaptado do fluido extracelular é convertido a glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase e liberado por intermédio de transportadores de glutamina para o meio extracelular. A glutamina liberada pelos astrócitos é captada pelas células neuronais e reconvertida a glutamato, pela enzima glutaminase. O tráfego de glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos parece ser a maior rota de reciclagem do neurotransmissor glutamato no SNC (DANBOLT, 2001).

Os astrócitos e neurônios expressam cinco isoformas de transportadores de glutamato de alta afinidade e dependentes de sódio, os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT): o transportador de glutamato e aspartato (GLAST ou EAAT1), o transportador de glutamato 1 (GLT1 ou EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 e EAAT5. O GLT1 é altamente expresso em astrócitos de todo o SNC, e a expressão do GLAST, que também é um transportador astrocitário, é baixa na maioria das regiões, com exceção da glia de Bergmann no cerebelo (ROTHSTEIN et al., 1996; NEDERGAARD et al., 2002).

A diversidade funcional do neurotransmissor glutamato é resultado da existência de uma grande variedade de receptores, os quais podem ser caracterizados em dois grupos, denominados ionotrópicos e metabotrópicos (GASIC & HOLLMAN, 1994). Os receptores ionotrópicos são uma família de canais iônicos caracterizados de acordo com seu agonista mais seletivo: NMDA, AMPA e KA. Os receptores metabotrópicos acoplam-se a proteínas-G e modulam efetores intracelulares (DUVOISIN et al., 1995).

Os receptores AMPA e KA são permeáveis a  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e são responsáveis pela rápida ativação da neurotransmissão excitatória no SNC (BLEAKMAN & LODGE, 1998;

SEGOVIA et al., 2001). O receptor do subtipo NMDA responde ao glutamato mais lentamente do que os receptores AMPA e KA, ativando canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , mas principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo dependente de voltagem e altamente regulado (SEGOVIA et al., 2001; MICHAELIS, 1998).

Estudos de clonagem e expressão gênica têm levado à identificação das subunidades dos receptores ionotrópicos, assim distribuídos: seis subunidades para receptores NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D e NR3), quatro para receptores AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4) e cinco para receptores KA (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2) (MICHAELIS, 1998; PRYBYLOWSKI & WENTHOLD, 2004).

Os oito subtipos de receptores metabotrópicos são classificados em três subgrupos, com base nas seqüências homólogas de seus aminoácidos. São eles: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3), grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (PIN & DUVOISIN, 1995). Os receptores do grupo I estão relacionados com a hidrólise de fosfolipídios de membrana, os receptores do grupo II e os do grupo III modulam a atividade da adenilato ciclase (DUVOISIN et al., 1995).

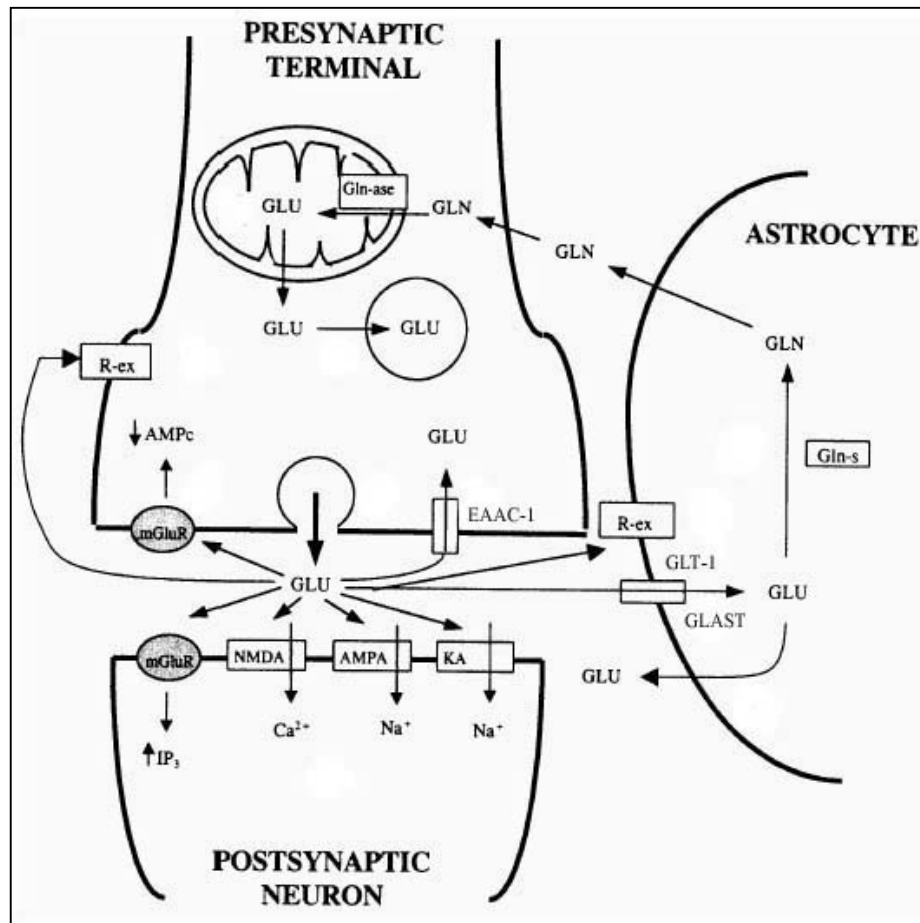


Figura 4: **Representação esquemática da transmissão glutamatérgica.** (Adaptado de SEGOVIA et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado a presença de subunidades de receptores glutamatérgicos (GluRs) ionotrópicos e de receptores metabotrópicos em astrócitos. Dentre eles, as subunidades NR1, NR2A e NR2B do receptor NMDA (JANSSENS & LESAGE, 2001), Glu 1-4 de AMPA (SEIFERT et al., 1997) e Glu 5-7 de kainato (DIANO et al., 1998) e os receptores metabotrópicos mGluR2, mGluR3 e mGluR4 (BALÁZ et al., 1997).

### 1.5. EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA:

A excessiva ativação da sinalização glutamatérgica pode levar à excitotoxicidade, um fenômeno onde a ativação excessiva dos GluRs desencadeia a morte celular (CHOI, 1987, LLANSOLA et al., 2000). O termo excitotoxicidade foi descrito pela primeira vez no final da década de 1950 em neurônios da retina (LUCAS & NEWHOUSE, 1957). Mais tarde, OLNEY (1969), observaram que esta vulnerabilidade é compartilhada por todos os neurônios que contém GluRs. A partir de então, a excitotoxicidade glutamatérgica têm sido implicada em insultos agudos ao SNC, como hipóxia e isquemia, e em doenças neurodegenerativas crônicas, como as Doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer (CHOI, 1988; LIPTON & ROSEMBERG, 1994).

Além de causar toxicidade para neurônios, o excesso de glutamato também pode estar envolvido na morte de células gliais. Glutamato pode induzir morte celular em astrócitos neocorticais (DAVID, 1996; CHEN et al., 2000) e em oligodendrócitos (MATUTE, 2002). A microglia parece ser o tipo celular menos susceptível à excitotoxicidade. Isto é devido ao fato de que estas células só expressam receptores para glutamato quando estão ativadas (MATUTE, 1997).

Estudos de microdiálise *in vivo* demonstraram que durante a isquemia (BAKER et al., 1991), hipoglicemia (SANDBERG et al., 1986) e trauma cerebral (FADEN et al., 1989) as concentrações extracelulares de glutamato e aspartato estão altamente elevadas, atingindo níveis comparáveis àqueles que são neurotóxicas em culturas de células (CHOI et al., 1987).

Em culturas primárias de neurônios cerebelares, a neurotoxicidade do glutamato é mediada principalmente pela excessiva ativação dos receptores NMDA, levando a um aumento nas concentrações de cálcio intracelular, ativação de proteases e nucleases, produção

de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, o que leva à desestabilização da membrana celular e indução de estresse oxidativo (FRANDSEN & SCHOUSBOE, 1993).

## **1.6. MORTE CELULAR:**

O fenômeno de morte celular, além de ser uma característica importante no desenvolvimento do sistema nervoso, parece também ser a causa de muitas doenças neurodegenerativas. Muitas destas doenças são caracterizadas por perda de neurônios em regiões específicas do sistema nervoso (MATTSON, 2000).

A morte celular excitotóxica pode ser tanto necrótica quanto apoptótica (BONFOCO et al., 1995; MATTSON, 2000). A necrose envolve rápido inchaço celular e é caracterizada por perda da integridade da membrana, resultando em perda de íons potássio, entrada de sódio e queda do potencial de membrana, queda energética com diminuição dos níveis de ATP, diminuição da síntese de macromoléculas, destruição da mitocôndria e de outras organelas até o rompimento da membrana celular e extravasamento do conteúdo intracelular (SASTRY & RAO, 2000).

A morte celular por apoptose é uma resposta programada, lenta em curso de tempo e envolvendo retração celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (KERR et al., 1972; CLARKE, 1990), sem diminuição dos níveis de ATP (MATTSON, 2000). A apoptose pode ser ativada por sinais intrínsecos ou extrínsecos. Dentre as características bioquímicas encontradas na apoptose ativada por sinais intrínsecos, pode-se citar a translocação de proteínas pró-apoptóticas da família das Bcl-2 (Bax e Bad) do citosol para a mitocôndria, com a conseqüente formação de poros na membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol. A presença do citocromo c no citosol leva à ativação de enzimas

denominadas caspases (cisteína-proteases) (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; MATTSON, 2000). Já a ativação da morte celular por apoptose por sinais extrínsecos envolve a ativação de um receptor de membrana, por exemplo o receptor de Fas (CD95) que interage com os domínios de morte celular de uma proteína associada ao Fas, levando a ativação da caspase 8 que por sua vez ativa as caspases 3 e 7 (ZHANG & HERMANN, 2002). A ativação de uma cascata de caspases pode então ativar DNases que são responsáveis pela clivagem do DNA em fragmentos internucleossomais (NAGATA, 2000) (Figura 5).

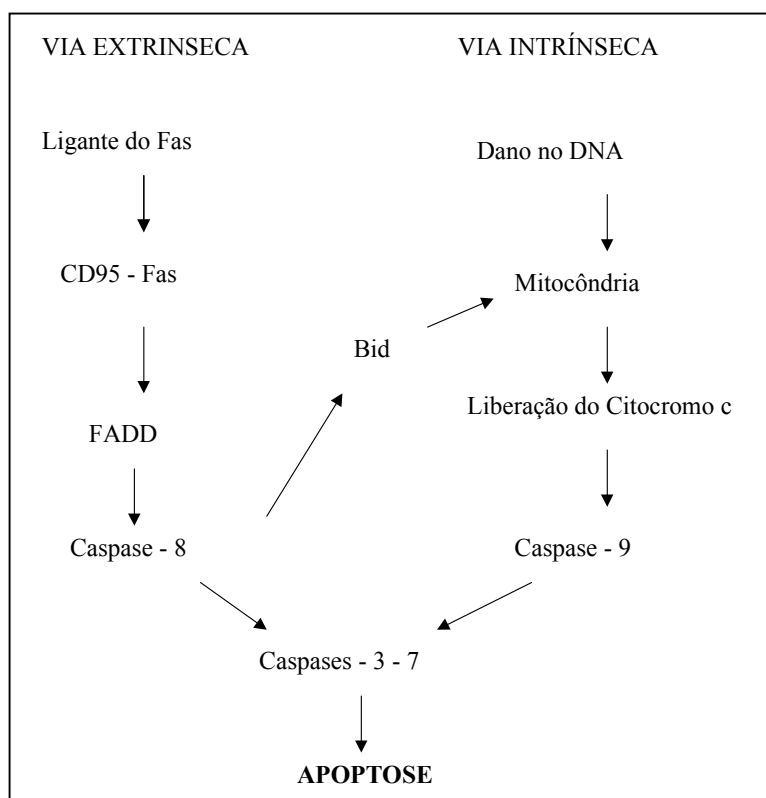


Figura 5: **Esquema representativo da morte celular apoptótica.** (Adaptado a partir de ZHANG & HERMANN, 2002). CD95 - receptor de Fas; FADD – proteína associada ao Fas com domínios de morte celular; Bid – proteína pró-apoptótica da família das Bcl-2.

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição de neurônios corticais ao glutamato pode causar necrose e apoptose dependendo da função mitocondrial (ANKARCRONA et al., 1995; ANKARCRONA, 1998). Por outro lado, tanto necrose como apoptose podem levar a uma diminuição na eficiência de captação do glutamato (MASSIEU & TAPIA, 1997). Modelos de isquemia *in vivo* demonstraram a ocorrência de necrose na zona isquêmica (local onde o acúmulo de glutamato causa dano celular), enquanto que na região de penumbra as células inicialmente sobrevivem para posteriormente morrerem por apoptose (IRVING et al., 2000).

Vários outros trabalhos utilizando diferentes modelos demonstram o envolvimento da ativação de receptores glutamatérgicos e a indução de morte celular por apoptose com liberação de citocromo c, ativação de caspases e fragmentação de DNA (HIRASHIMA et al., 1999; THOMAS & MAYLE, 2001; CHEN, et al., 2001; HIRAI et al., 2002).

Recentes trabalhos demonstraram que a adenosina e alguns de seus análogos induzem apoptose via receptor de adenosina do sub-tipo A<sub>3</sub> e via modulação da atividade da enzima S-adenosilhomocisteína em culturas primárias de astrócitos corticais, porém o tratamento de astrócitos corticais com altas concentrações de GUO (acima de 500μM) não foi suficiente para induzir apoptose (ABBRACCHIO et al, 1995; IORIO et al., 2002).

Assim, considerando-se os efeitos tróficos sobre neurônios e astrócitos e os efeitos sobre a modulação da transmissão glutamatérgica, tem sido sugerido que os DG podem agir na manutenção da integridade celular ou na restauração e remodelagem do tecido nervoso após trauma, isquemia ou doenças neurodegenerativas. Considerando o que foi exposto, o presente estudo avalia a neurotoxicidade induzida pelo glutamato em astrócitos cerebelares de ratos, enfatizando a investigação do tipo de morte celular (apoptose ou necrose) e o possível papel neuroprotetor do GMP frente à neurotoxicidade glutamatérgica. Além disso,

avalia os efeitos do GMP e da GUO sobre a neurogênese e neuritogênese em neurônios co-cultivados com astrócitos pré-tratados com GMP e GUO, assim como analisa os efeitos de GUO e GMP sobre a organização de proteínas da MEC em astrócitos cerebelares em cultura.



## **2.0. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar o possível papel neuroprotetor e/ou neurotrófico dos nucleotídeos e nucleosídeo derivados da guanina (DG) em astrócitos em cultura submetidos a incubações com glutamato e em co-culturas com neurônios granulares cerebelares.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar a neurotoxicidade do glutamato em culturas de astrócitos cerebelares e determinar o tipo de morte celular envolvida (necrose ou apoptose);
2. Avaliar o potencial efeito protetor do GMP frente à toxicidade glutamatérgica em culturas de astrócitos cerebelares;
3. Avaliar a neurogênese e a neuritogênese em neurônios cerebelares mantidos em co-cultura com astrócitos cerebelares tratados com GMP ou GUO;
4. Analisar a organização das proteínas da matriz extracelular, laminina e fibronectina, em astrócitos cerebelares tratados com GMP ou GUO.

### 3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS:

##### 3.1.1 Reagentes:

Ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e metanol foram adquiridos da Reagen.

Ácido bórico, película de Hyperfilm foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech.

Albumina sérica bovina (BSA), anticorpo anti-bromodeoxiuridina (BrdU), anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina III, anticorpo monoclonal anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP), anticorpo policlonal anti-laminina, anticorpo secundário anti-IgG de coelho Cy3, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), entelan, glicerol, L-glutamato, glutamina, guanosina 5'-monofosfato (GMP), guanosina (GUO), Hoescht 33342, n-propil-galacto-glicerol, poli-ornitina, soro normal de cabra (NGS) e tripsina foram adquiridos da Sigma.

Anticorpo policlonal anti-fibronectina foi adquirido da Dako.

Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase foi adquirido da Invitrogen.

Cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato de potássio, fosfato de sódio dibásico, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12), soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos da Gibco.

Filmes fotográficos, Fuji Superia Iso 400.

Garrafas para cultura de células e placas de 24 poços TPP, foram adquiridas da Biosystems.

Glicose e peróxido de hidrogênio foram adquiridos da Merck.

Kit colorimétrico para dosagem da Lactato desidrogenase (LDH) foi adquirido da Analisa Diagnóstica.

Kit de revelação do anticorpo conjugado à peroxidase VIP foi adquirido da VECTOR.

Paraformaldeído (PF) foi adquirido da Vetec.

Ponceau e Tween-20 foram obtidos da USB.

Soluções reveladora e fixadora foram obtidos da KODAK.

### **3.1.2 Equipamentos:.**

Agitador magnético, Q-221-2 – Quimis.

Banho-maria, dbm 120 – Benfer.

Câmara de Neubauer, Hirschmann Techcolor.

Centrífuga, VI – Continental.

Centrífuga, 5415 D – Eppendorf.

Espectrofotômetro – Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech.

Estufa úmida de CO<sub>2</sub>, Nuaire.

Fluxo laminar, Veeco.

Microscópio de fluorescência, modelo Elipse TE300, Nikon.

Microscópio de fluorescência, Zeiss.

Potenciômetro – DM20, Digimed.

Software Sigma Scan Pro, Jandel Scientific.

### 3.2 ANIMAIS:

Ratos Wistar de 1 a 3 dias ou 7 a 10 dias pós-natal, de ambos os sexos foram utilizados para as culturas de células. Fêmeas prenhas foram obtidas do Biotério Central da UFSC e mantidas em ciclo claro/escuro de 12 horas, a 25 °C, com ração e água *ad libitum*. Os “Princípios Éticos do COBEA” foram seguidos para todos os experimentos. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela CEUA/UFSC.

### 3.3 CULTURAS DE CÉLULAS:

**3.3.1. Astrócitos** – As culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir do cerebelo de ratos neonatos (1 a 3 dias), conforme a metodologia utilizada por TRENTIN et al. (1995). Em cada preparação, cerebelos de seis animais eram dissecados em placas de Petri, contendo solução salina tamponada por fosfato com 33 mM de glicose (PBS-glicose). Após dissociação mecânica com pipeta Pasteur, as células eram centrifugadas, ressuspensas em  $3 \times 10^5$  células/ml de meio e semeadas na densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/poço em placas com 24 poços, preparadas com poli-ornitina (10 µg/ml) uma hora antes de as células serem semeadas, e mantidas em meio de DMEM-F12 com 10 % de FBS. As células eram mantidas em estufa 37° C em atmosfera umidificada de 95% ar e 5% CO<sub>2</sub> e o meio de cultura era trocado após 24 horas.

**3.3.2. Neurônios para co-cultura** – As culturas de neurônios granulares cerebelares foram preparadas conforme descrito por THANGNIPON et al (1983), a partir de ratos Wistar de 7 a 10 dias pós-natal. Os cerebelos dissecados foram incubados com solução de 2,5 % de Tripsina

por 10 minutos a 37° C e dissociados mecanicamente na presença de 10 % de FBS (inibidor de tripsina). As células foram semeadas na densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço em placas com 24 poços sobre uma monocamada de astrócitos em meio sem soro e mantidas por 24h em estufa a 37°C em atmosfera umidificada de 95% ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4 TRATAMENTO DAS CULTURAS:**

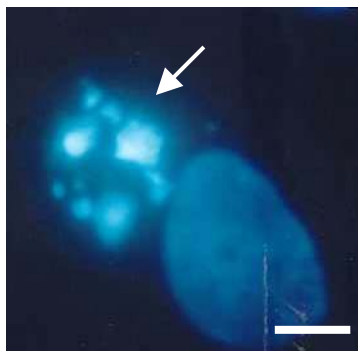
**3.4.1. Astrócitos** – Após atingir confluência (aproximadamente 10-15 dias em cultura), os astrócitos foram pré-tratados por 24 ou 48h com GMP ou GUO (1 µM, 100 µM ou 1 mM). Quando presente, o glutamato (1 ou 10 mM) foi incubado em meio sem soro por 24 ou 48h (CHEN et al., 2000).

**3.4.2. Co-culturas** – após o tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO nas concentrações de 1 µM, 100 µM ou 1 mM, neurônios foram semeados sobre a monocamada de astrócitos e mantidos em meio sem soro por 24h.

### **3.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR:**

**3.5.1 Detecção de apoptose:** Os eventos que caracterizam a apoptose foram avaliados pela fragmentação da cromatina, através da utilização do corante Hoescht 33342 que permite a visualização nuclear (NEGRI et al., 1997). As células foram cultivadas em lamínulas de vidro e após o tratamento e o meio de cultura removido, o corante foi adicionado (5 µg/mL) e as placas incubadas por 30 minutos a 37°C. As células foram, então, lavadas com PBS e observadas em microscópio de fluorescência Elipse TE300, Nikon (emissão a 465 nm e

excitação a 355 nm). Do total de células contadas foi determinado o número de células com núcleo picnótico, para quantificar a porcentagem de células com características apoptóticas.



**Figura 6: Imagem representativa de microscopia de fluorescência de um núcleo picnótico (seta) e um núcleo normal de astrócitos corados com HOESCHT 33342. Barra = 8  $\mu$ m**

**3.5.2 Avaliação da morte por necrose com Iodeto de Propídio (PI):** O PI é um corante que não atravessa a membrana plasmática de células íntegras (SKEHAN, 1998). Assim, utilizamos o PI como marcador de células necróticas, uma vez que estas células têm como característica a alteração da permeabilidade e rompimento da membrana plasmática. Após o tratamento com GMP ou Glu, o meio de cultura foi retirado e o corante foi adicionado na concentração de 7  $\mu$ g/ml. Após incubação por 5 minutos a 37° C, as células foram lavadas com PBS, as lâminas montadas com n-propilgalatosídeo e observadas em microscópio de fluorescência Elipse TE300, Nikon (emissão 510nm e excitação a 488nm). Do número total de células contadas, o número de células marcadas com PI foi quantificado para determinar a porcentagem de células necróticas.

**3.5.3 Avaliação da liberação da enzima Lactato desidrogenase (LDH):** A atividade da LDH no meio extracelular foi medida através da utilização de um Kit colorimétrico (leitura a 500 nm), adaptado a partir das instruções do fabricante. A LDH intracelular foi determinada pela adição de 1 % de Triton X-100 e ruptura mecânica das células. A LDH total foi obtida através do somatório da LDH intra e extracelular (WHITAKER, 1969).

### **3.6 IMUNOCITOQUÍMICA:**

**3.6.1. Fixação das células:** as monocamadas de astrócitos foram fixadas com 4 % de paraformaldeído (PF) por 2 a 10 minutos a temperatura ambiente e as membranas celulares permeabilizadas com 0,2 % de Triton X-100 por 15 minutos. Para a imunocitoquímica contra laminina e fibronectina as células não foram permeabilizadas. A peroxidase endógena foi inibida com 3 % de  $H_2O_2$  por 15 minutos, para a marcação da  $\beta$ -tubulina III. Sítios inespecíficos de ligação dos anticorpos foram bloqueados pela incubação das células com 5 % de BSA diluída em PBS (PSB-BSA) por 30 minutos.

**3.6.2 Imunomarcação da GFAP** – Após fixadas, as células foram incubadas por 12h, a 4° C, em câmara úmida, com anticorpo primário anti-GFAP de camundongo (diluição de 1:500) e o com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (diluição de 1:400) por 1h, a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS as células foram co-marcadas com Hoescht 33342, por 30 minutos, à temperatura ambiente, para análise do número total de células. As lâminas foram montadas com n-propilgalactosídeo, analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Zeiss).

**3.6.3 Imunomarcação de Fibronectina e Laminina** – Após a fixação, as células foram incubadas por 12h, a 4° C, em câmara úmida, com anticorpo primário de coelho anti-fibronectina humana (diluição de 1:400) ou anti-laminina de camundongo (diluição de 1:30) e o com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à rodamina (Cy3) (1:5000) por 1h, a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS as células foram incubadas com Hoescht 33342 (5 µg/ml), por 30 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com n-propilgalactosídeo, analisadas e fotografadas com microscópio de fluorescência (Zeiss).

**3.6.4 Imunomarcação de  $\beta$ -tubulina III** – Após a fixação, as células foram incubadas por 12h com anticorpo primário de camundongo anti- $\beta$ -tubulina III humana (diluição de 1:400) a 4° C, em câmara úmida, e 1h a temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (diluição de 1:200). A revelação foi realizada com um Kit específico VIP. As lâminas foram montadas com Entelan após desidratação com banho de álcool absoluto.

**3.7 MORFOMETRIA:** imagens de neurônios marcados com anticorpo anti- $\beta$ -tubulina III foram capturadas a partir de um sistema de captura de imagens acoplado a um microscópio de fluorescência Nikon. O número de neurônios e neuritos por neurônios e o comprimento total dos neuritos foram analisados utilizando-se o software Sigma Scan Pro (Jandel Scientific). Três experimentos independentes foram realizados em triplicatas e cerca de 100 neurônios por poço, selecionados de cinco campos aleatoriamente escolhidos, foram analisados. A análise quantitativa dos dados morfométricos foi realizada utilizando o programa Microsoft Excel versão 2000.



### **3.8 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR:**

**3.8.1 Imunocitoquímica anti-BrdU:** no momento em que os astrócitos foram tratados com GMP ou GUO, 3 µl de uma solução de BrdU (0,1 mg/ml) foram adicionados às células. Para a avaliação da proliferação neuronal, 3 µl da solução de BrdU (0,1 mg/ml) foram adicionados juntamente com as células sobre a monocamada de astrócitos pré-tratados. Após 24h, as células foram fixadas com PF 4 % por 20 minutos, lavadas três vezes com PBS e duas vezes com H<sub>2</sub>O destilada. As células foram então, incubadas com 2 N de HCl a 50° C por 10 minutos, duas vezes e com 0,1 M de Tampão Borato (pH 8,5) uma vez a 50° C e uma vez a temperatura ambiente. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo foram bloqueados com PBS/10 % de NGS/0,01 % de Triton X-100 por 30 minutos. A incubação do anticorpo primário anti-BrdU (diluição de 1:500 em PBS/10 % de NGS/0,01 % de Triton X-100) foi feita por 12h, a 4° C em câmara úmida e o anticorpo secundário anti-IgG conjugado à rodamina (diluição de 1:400 em PBS/10 % de NGS/0,01 % de Triton X-100) foi incubado a temperatura ambiente por 1h. Após três lavagens com PBS as células foram incubadas com Hoescht 33342 (5 µg/ml), por 1h, à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com n-propilgalactosideo, analisadas e fotografadas com microscópio de fluorescência Nikon. Foram contadas cerca de 400 células de cinco campos por lamínula, aleatoriamente escolhidos de dois experimentos realizados em triplicatas.

**3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA:** Os resultados foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Newmann-Keuls, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4.0. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ASTRÓCITOS:

Para caracterizar as culturas de astrócitos, foi realizada a imunofluorescência contra a GFAP (Figura 7) e comparando-se as células positivas para GFAP com os núcleos corados com Hoescht 33342, observou-se que cerca de 95 % das células, após 10 a 15 dias *in vitro*, são astrócitos.

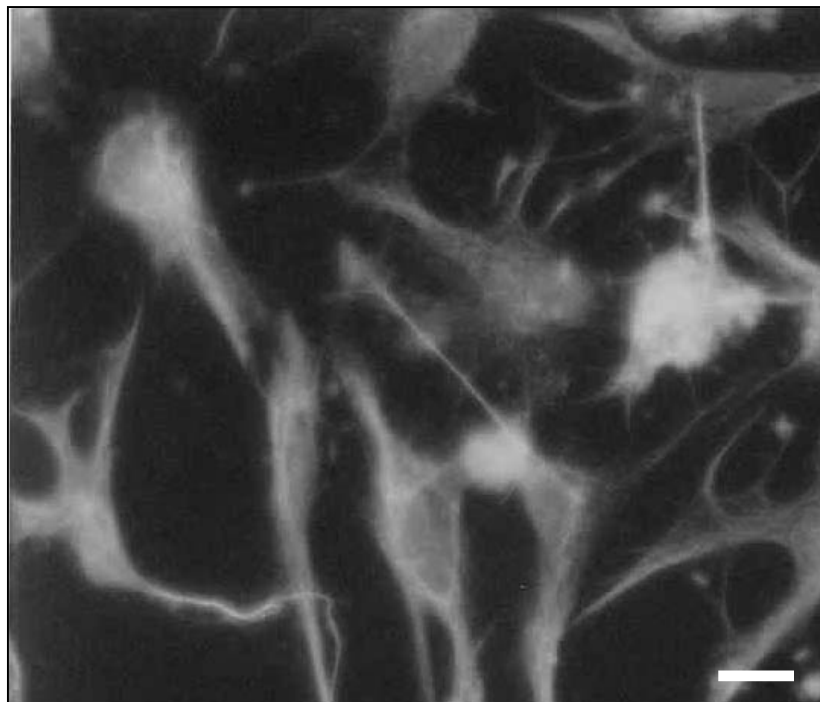


Figura 7: **Caracterização dos astrócitos cerebelares de ratos neonatos marcados para GFAP.** Os astrócitos foram mantidos em meio sem soro por 24h, fixados e utilizados para imunocitoquímica anti-GFAP. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

## **4.2 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR:**

Com o objetivo de avaliar a toxicidade induzida pelo glutamato e a possível neuroproteção pelo GMP em astrócitos cerebelares de ratos Wistar neonatos, analisamos o tipo de morte celular (apoptose ou necrose) após incubação das células com diferentes concentrações de glutamato ou GMP por 24h ou 48h. Os parâmetros utilizados no estudo da morte celular foram a condensação da cromatina (através da coloração com Hoescht), coloração com iodeto de propídio (PI), liberação da enzima Lactato desidrogenase (LDH) e análise por contraste de fase.

### **4.2.1 Avaliação do número total de células após o tratamento com Glu, GMP ou Glu e GMP, por 24 ou 48h:**

Na Figura 8, observa-se o número total de células contadas em cinco campos aleatoriamente escolhidos, após tratamento com GMP e/ou glutamato (Glu), por 24h ou 48h. Observou-se que 1 mM de GMP e/ou 10 mM de Glu não alteram o número total de astrócitos após 24h ou 48h de incubação.

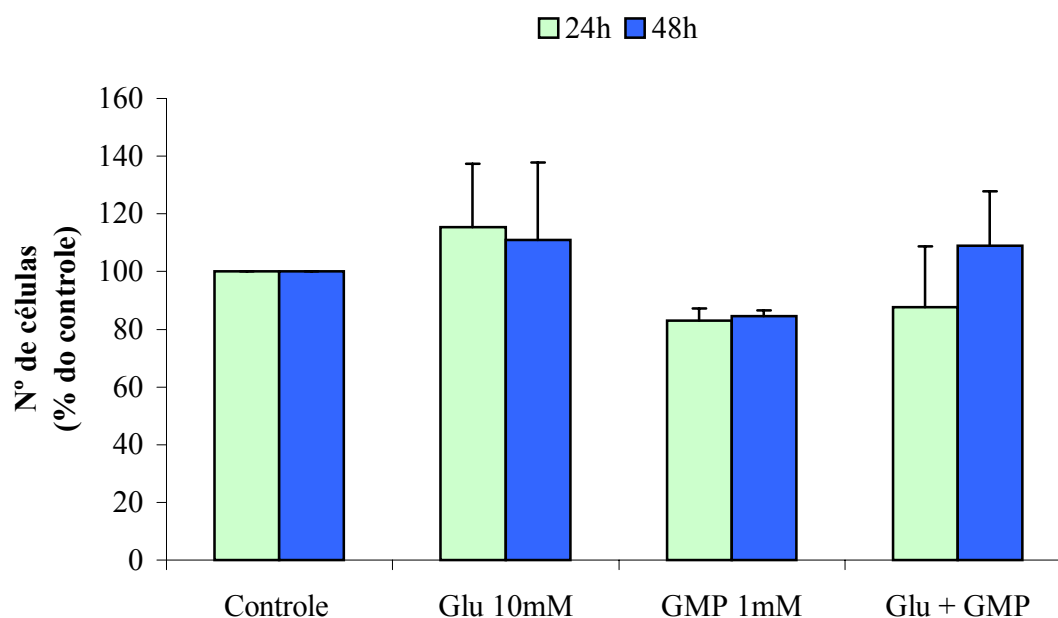


Figura 8: **Efeitos do Glu e do GMP sobre o número de astrócitos em cultura.** Os astrócitos foram tratados com 1 mM de GMP e/ou 10 mM de Glu por 24h ou 48h. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 mg/ml) e os núcleos das células foram contados. A média do número de células correspondente aos 100 % no controle (24 e 48h) é de  $225 \pm 86$  células. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em duplicatas.

#### 4.2.2 Detecção de morte por apoptose:

Nas figuras 9 e 10, foram avaliados os efeitos do Glu e de GMP sobre a indução de apoptose em astrócitos em cultura. Para tanto, após a confluência, cerca de 10-15 dias *in vitro*, os astrócitos foram incubados com Glu (1 mM ou 10 mM) ou GMP (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM) por 24 ou 48h, e então incubados com o corante HOESCHT 33342 (5 mg/ml) por 30 minutos. Observou-se que 1 mM ou 10 mM de Glu não induziram apoptose em astrócitos cerebelares nas condições estudadas, assim como o GMP não induziu apoptose nos astrócitos, em nenhuma das concentrações utilizadas.

Vários estudos têm demonstrado que os DG podem agir inibindo respostas induzidas por glutamato (TASCA et al., 1995; TASCA et al., 1998) aumentar a recaptação de glutamato por astrócitos (FRIZZO et al., 2001) e inibir a união do glutamato aos seus receptores (MONAHAN et al., 1988; SOUZA & RAMÍREZ, 1991; PAZ et al., 1994; PAAS et al., 1996; DEV et al., 1996, TASCA et al., 1999a; BURGOS et al., 2000; PORCIÚNCULA et al., 2002). Assim, avaliamos a interação entre GMP e glutamato sobre a indução de apoptose em astrócitos. GMP (1 mM) também não induz apoptose em astrócitos cerebelares quando incubado sozinho (Figura 10) ou juntamente com Glu (10 mM) (Figuras 11, 12 e 13).

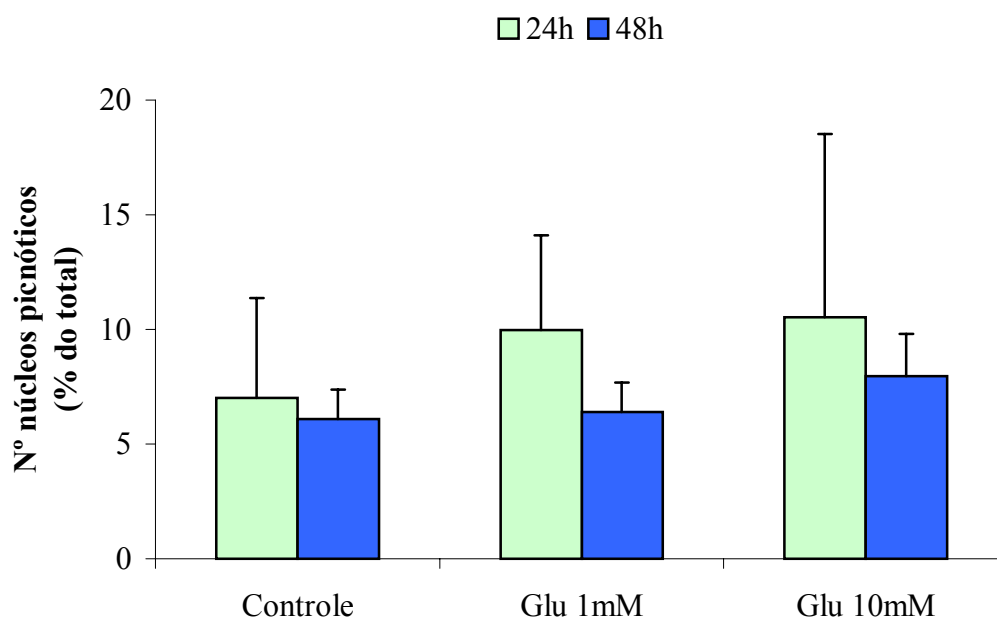


Figura 9: **Efeito do Glu e do tempo de incubação na indução de apoptose em astrócitos em cultura.** Os astrócitos foram tratados com Glu (1 mM ou 10 mM) por 24h ou 48h. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 mg/ml) e os núcleos picnóticos foram contados. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos realizados em duplicatas.

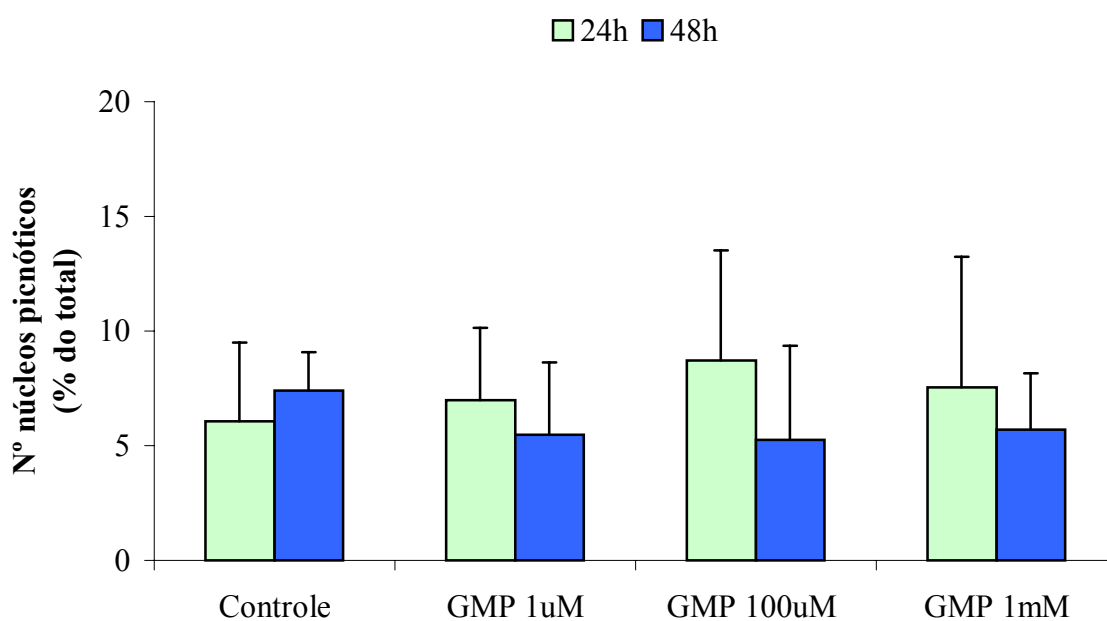


Figura 10: Efeito das diferentes concentrações de GMP e do tempo de incubação na indução de apoptose em astrócitos em cultura. Os astrócitos foram tratados com GMP (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM) por 24h ou 48h. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 mg/ml) e os núcleos picnóticos foram contados. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos realizados em duplicatas.

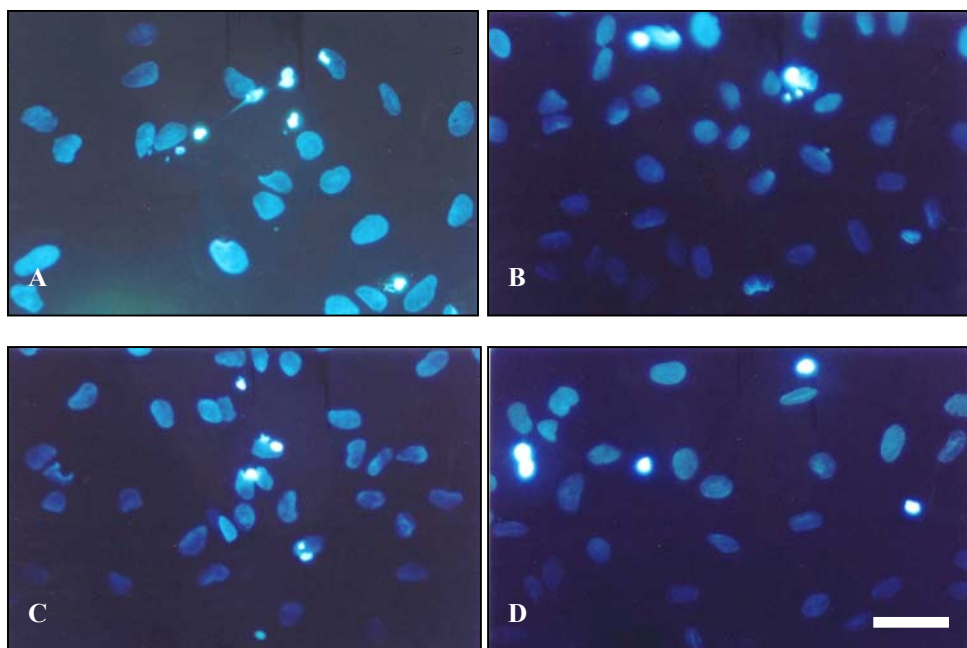


Figura 11: **Imagens de microscopia de fluorescência de astrócitos corados com HOESCHT 33342 após 24h de exposição ao Glu e ao GMP.** Os astrócitos foram tratados com 1 mM de GMP e/ou 10mM de Glu por 24h e as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 mg/ml). (A) controle; (B) Glu 10 mM; (C) GMP 1 mM; (D) Glu 10 mM + GMP 1 mM, 24h. Os núcleos celulares apoptóticos, com condensação de cromatina, são observados pela coloração intensa. Barra = 20  $\mu$ m.



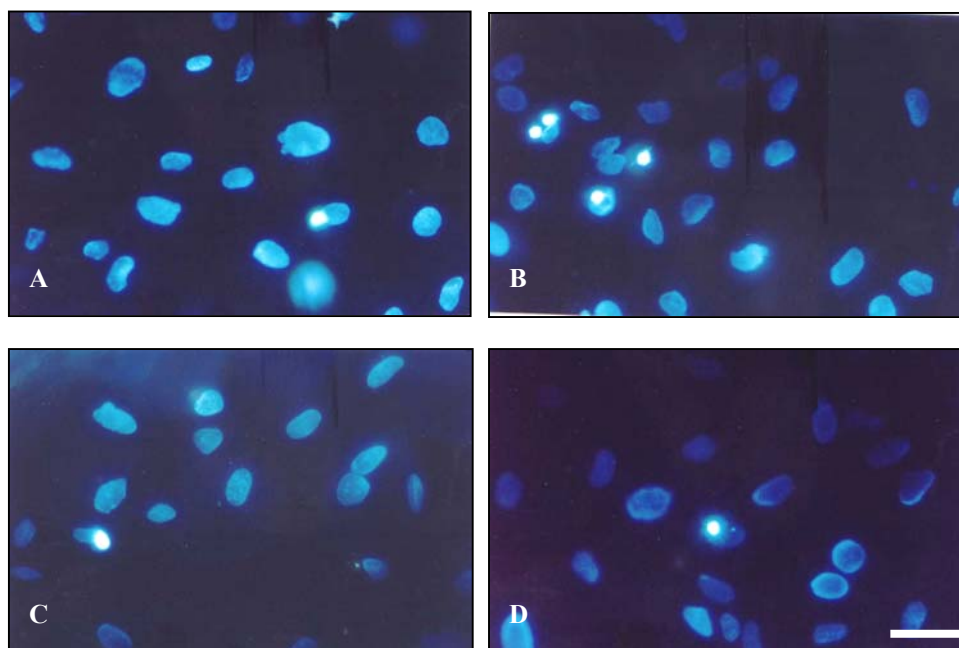


Figura 12: **Imagens de microscopia de fluorescência de astrócitos corados com HOESCHT 33342 após 48h de exposição ao Glu e ao GMP.** Os astrócitos foram tratados com 1 mM de GMP e/ou 10mM de Glu por 48h e as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 mg/ml). (A) controle; (B) Glu 10 mM; (C) GMP 1 mM; (D) Glu 10 mM + GMP 1 mM, 48h. Os núcleos celulares apoptóticos, com condensação de cromatina, são observados pela coloração intensa. Barra = 20  $\mu$ m.

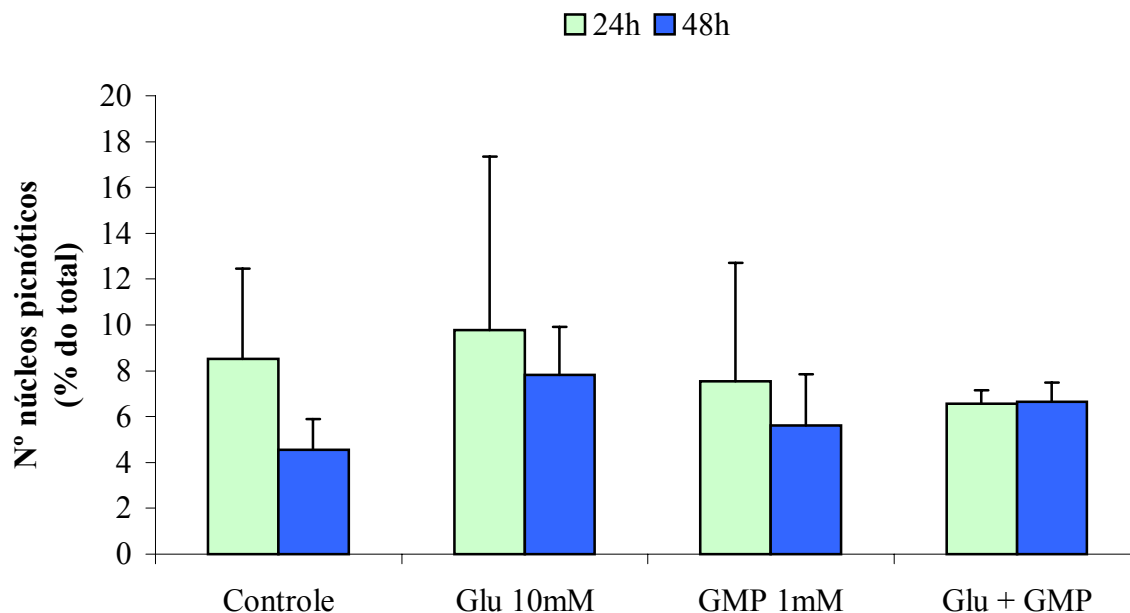


Figura 13: **Efeitos do Glu e do GMP na indução de apoptose em astrócitos em cultura.** Os astrócitos foram tratados com 1 mM de GMP e/ou 10mM de Glu por 24h ou 48h. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 mg/ml) e os núcleos picnóticos foram contados. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em duplicatas.

### 4.2.3 Detecção da morte por necrose:

Utilizamos a avaliação da liberação da LDH e a coloração com PI como marcadores da morte celular por necrose, uma vez que este tipo de morte celular tem como característica a alteração da permeabilidade e possível rompimento da membrana plasmática com o extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular (CLARKE, 1990), e o PI é um corante que não atravessa a membrana plasmática de células íntegras (SKEHAN, 1998).

Após o tratamento com GMP, Glu ou GMP e Glu, por 24h ou 48h, os astrócitos foram incubados com HOESCHT 33342 por 30 minutos e com PI por 5 minutos. O número de núcleos corados com PI foi analisado em relação ao número total de núcleos corados com HOESCHT 33342. Observou-se que o tratamento dos astrócitos com 10 mM de Glu por 48h aumentou significativamente o número de células com alteração na permeabilidade da membrana quando comparado com o controle, com o tratamento com 10 mM de Glu por 24h, ou com 1 mM de Glu por 48h (Figura 14).

A medida da liberação da LDH demonstrou que o tratamento dos astrócitos com 10 mM de Glu por 48h não é alterada quando comparada ao controle (Figura 15). Quando os astrócitos foram tratados com GMP (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM) por 24h ou 48h não foi observado aumento no número de células necróticas, pela marcação com PI ou através da avaliação da liberação da LDH (Figuras 16 e 17).

Nas Figuras 19 e 20, observa-se que nos astrócitos tratados com 10 mM de Glu por 48h, há um aumento significativo no número de núcleos marcados com PI e que 1 mM de GMP não protege os astrócitos da toxicidade do glutamato após 48 h de incubação. Além disso, observa-se na Figura 18 que o tratamento dos astrócitos com 10 mM de Glu e 1 mM de GMP não altera o número de células necróticas após 24 h. Quando avaliamos a liberação da

LDH (Figura 21), observamos que não há aumento, após 24h ou 48h de tratamento dos astrócitos com 1 mM de GMP e/ou 10 mM de Glu.

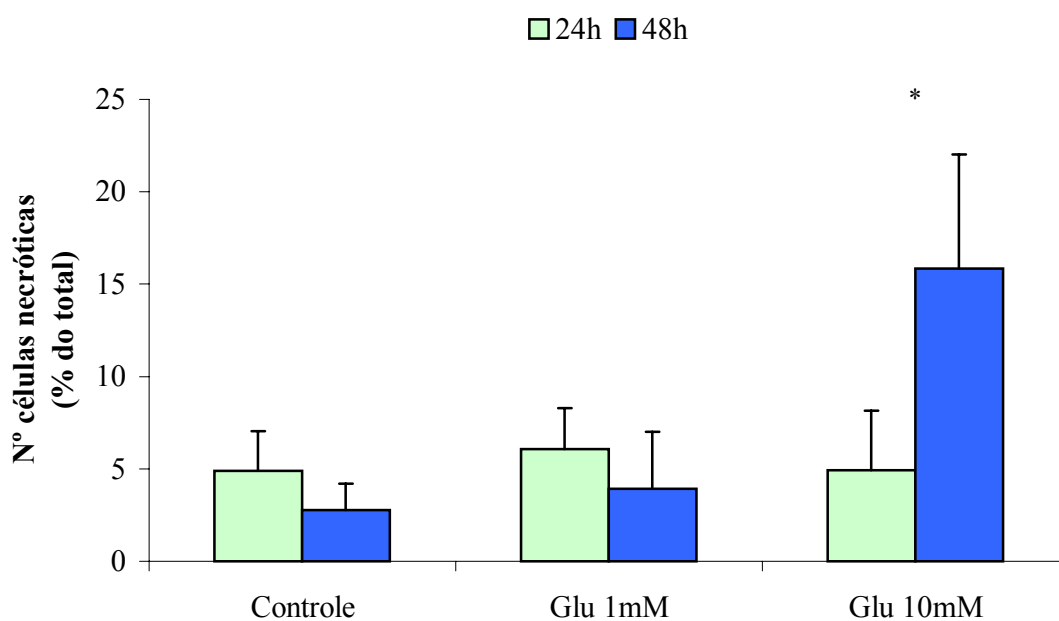


Figura 14: **Efeitos do Glu e do tempo de incubação na indução de necrose em astrócitos em cultura.** Os astrócitos foram tratados com Glu (1 mM ou 10 mM) por 24h ou 48h. Após o tratamento, as células foram coradas com Iodeto de Propídio (7 mg/ml) e as células necróticas foram contadas. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em duplicatas. \* representa média diferente dos grupos Controle, 48h; Glu 1 mM, 48h e Glu 10 mM, 24h ( $p < 0,01$ ).

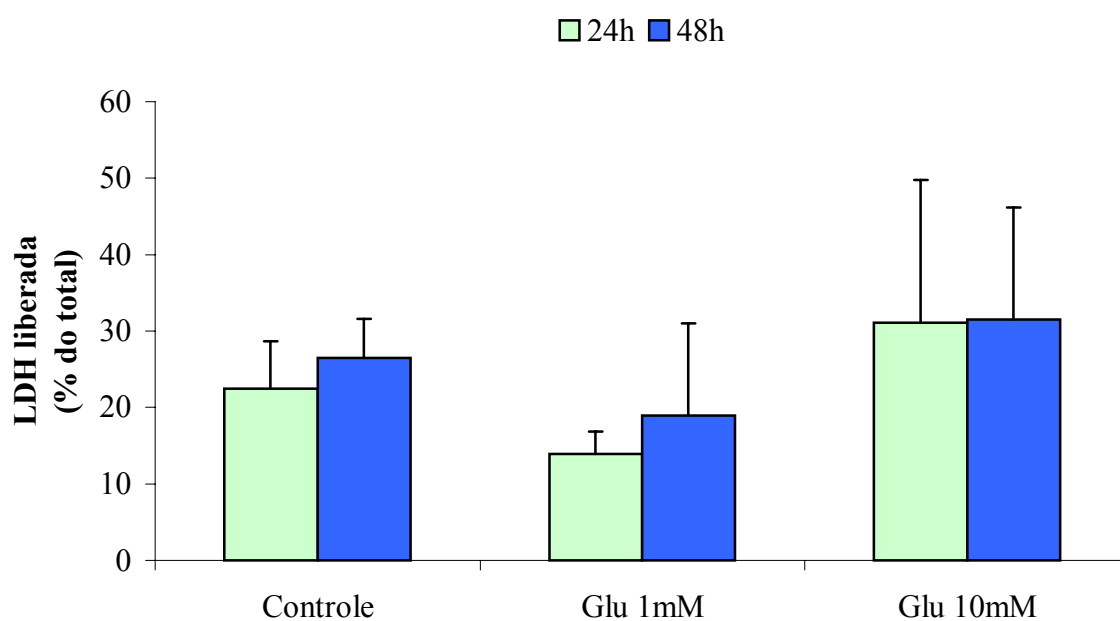


Figura 15: **Efeitos do Glu e do tempo de incubação na liberação de LDH em astrócitos em cultura.** Os astrócitos foram tratados com Glu (1 mM ou 10 mM) por 24h ou 48h. A liberação da LDH foi medida como descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos realizados em triplicatas. \* representa médias diferentes do grupo Glu 1 mM, 24h ( $p < 0,05$ ).

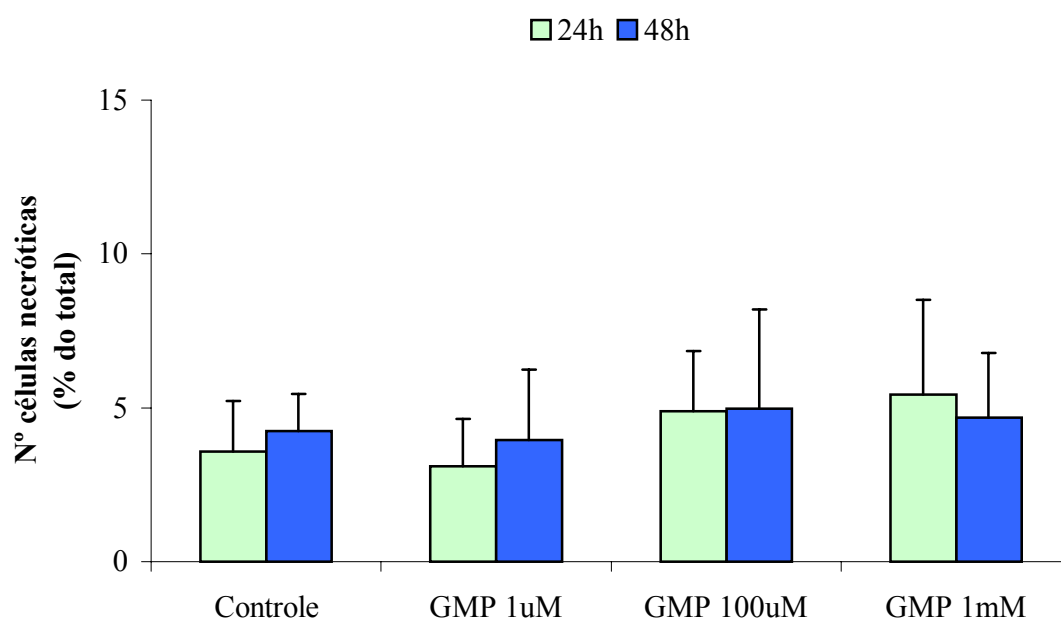
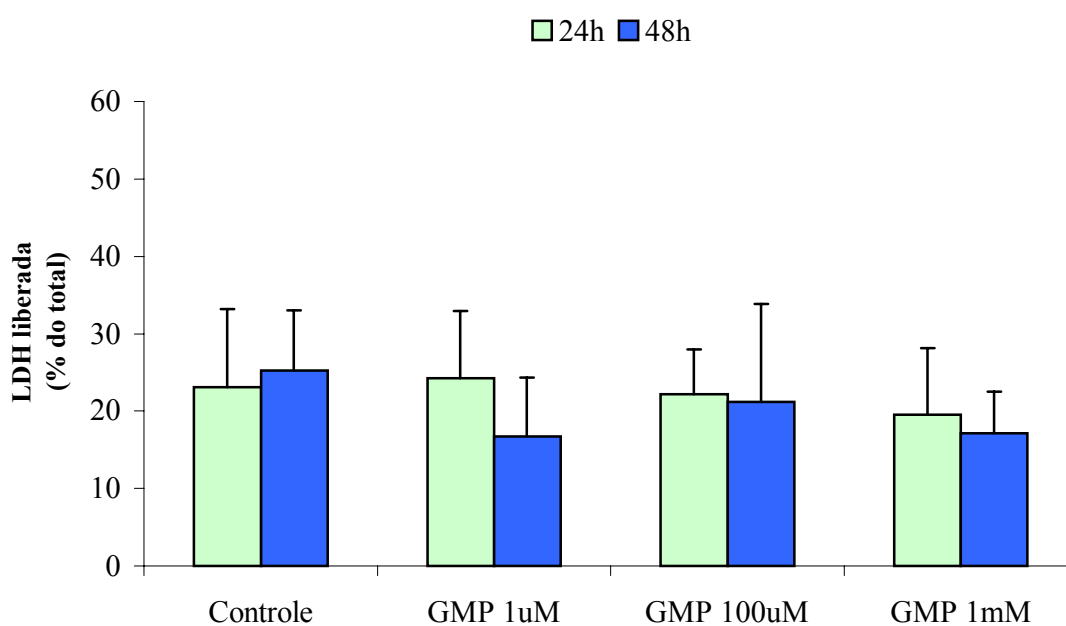


Figura 16: Efeito das diferentes concentrações de GMP e do tempo de incubação na indução de necrose em astrócitos em cultura. Os astrócitos foram tratados com GMP (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM) por 24h ou 48h. Após o tratamento, as células foram coradas com Iodeto de Propídio (7 mg/ml) e as células necróticas foram contadas. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em duplicatas.



**Figura 17: Efeitos do GMP na liberação de LDH em astrócitos em cultura.** Os astrócitos foram tratados com GMP (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM) por 24h ou 48h. A liberação da LDH foi medida como descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos realizados em triplicatas.

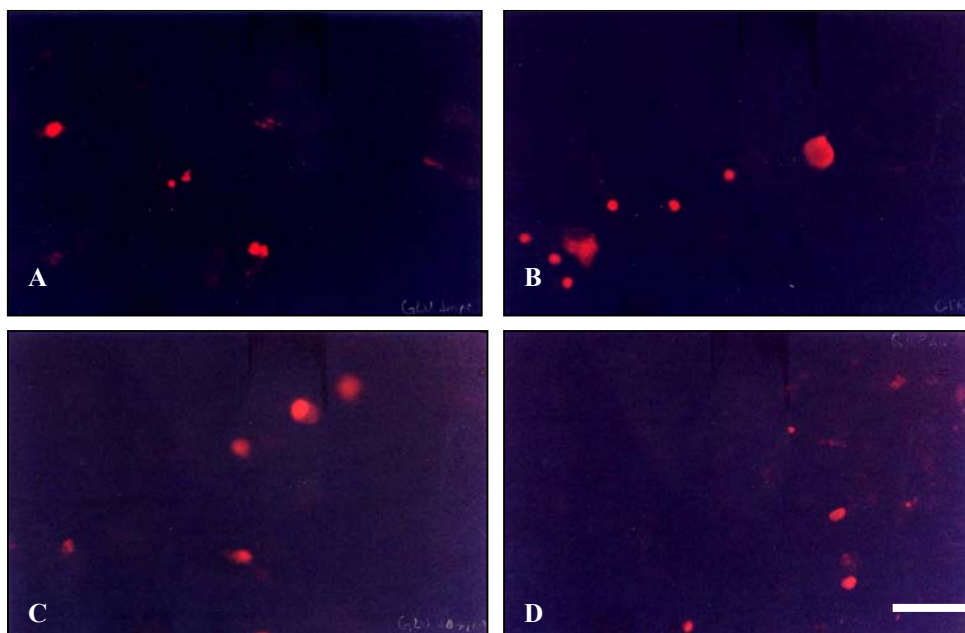


Figura 18: **Imagens de microscopia de fluorescência de astrócitos corados com Iodeto de propídio após 24h de exposição ao Glu e ao GMP.** Os astrócitos foram tratados com 1 mM de GMP e/ou 10mM de Glu por 24h e as células foram coradas com PI (7 mg/ml). (A) controle; (B) Glu 10 mM; (C) GMP 1 mM; (D) Glu 10 mM + GMP 1 mM, 24h. Os núcleos das células necróticas são observados em vermelho. Barra = 20  $\mu$ m.



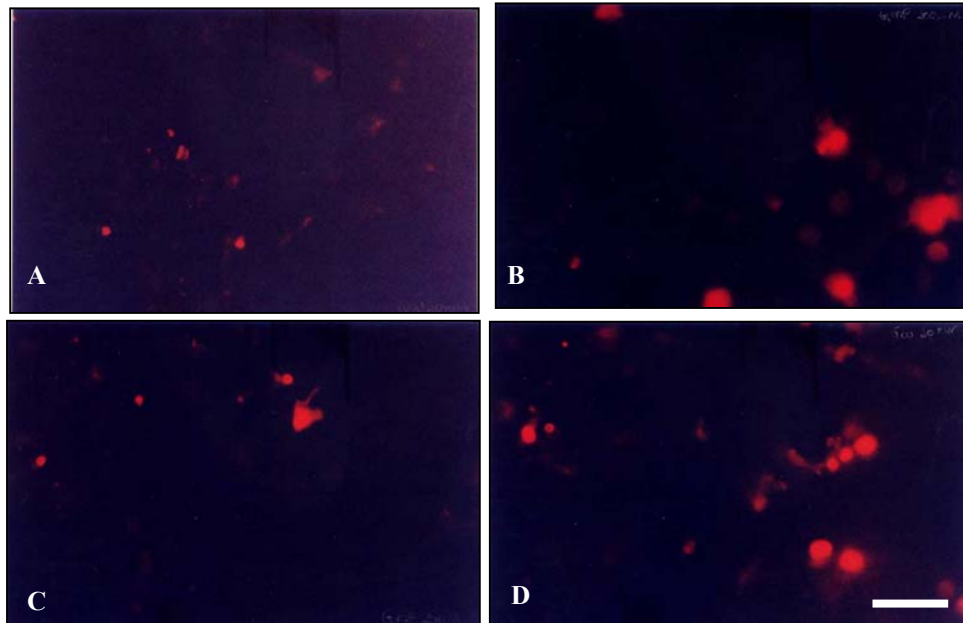


Figura 19: **Imagens de microscopia de fluorescência de astrócitos corados com Iodeto de propídio após 48h de exposição ao Glu e ao GMP.** Os astrócitos foram tratados com 1 mM de GMP e/ou 10mM de Glu por 48h e as células foram coradas com PI (7 mg/ml).. Após 48h de exposição ao Glu e ao GMP: (A) controle; (B) Glu 10 mM; (C) GMP 1 mM; (D) Glu 10 mM + GMP 1 mM, 48h. Os núcleos das células necróticas são observados em vermelho. Barra = 20  $\mu$ m.

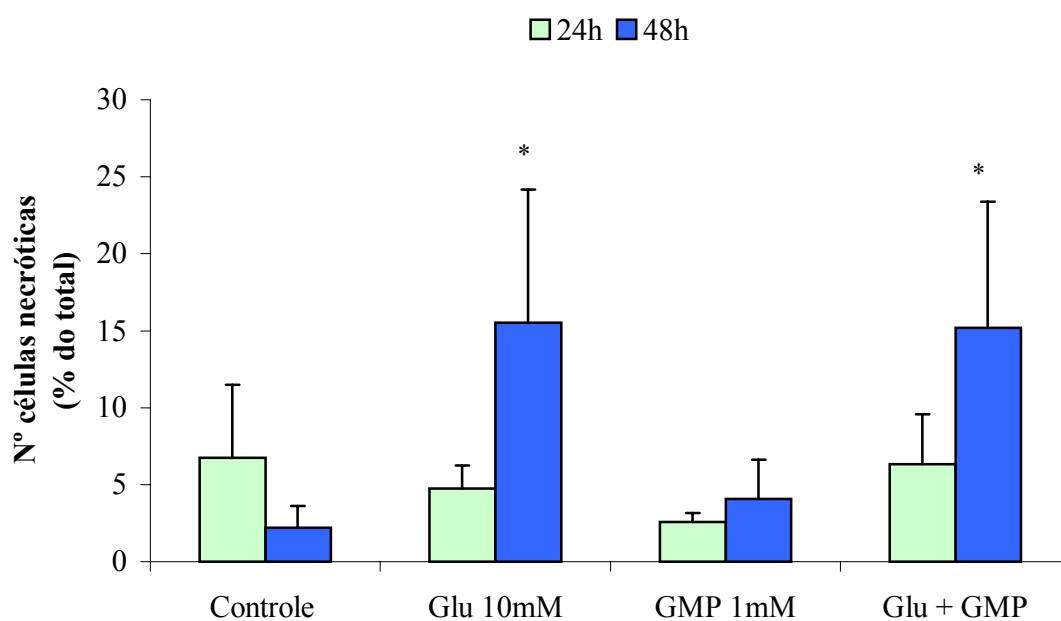


Figura 20: **Efeitos do Glu e do GMP na indução de necrose em astrócitos em cultura.** Os astrócitos foram tratados com 1 mM de GMP e/ou 10 mM de Glu por 24h ou 48h. Após o tratamento, as células foram coradas com Iodeto de Propídio (7 mg/ml) e os núcleos necróticos foram contados. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos realizados em duplicatas. \* representa médias diferentes do grupo Controle, 48h ( $p < 0,01$ ).

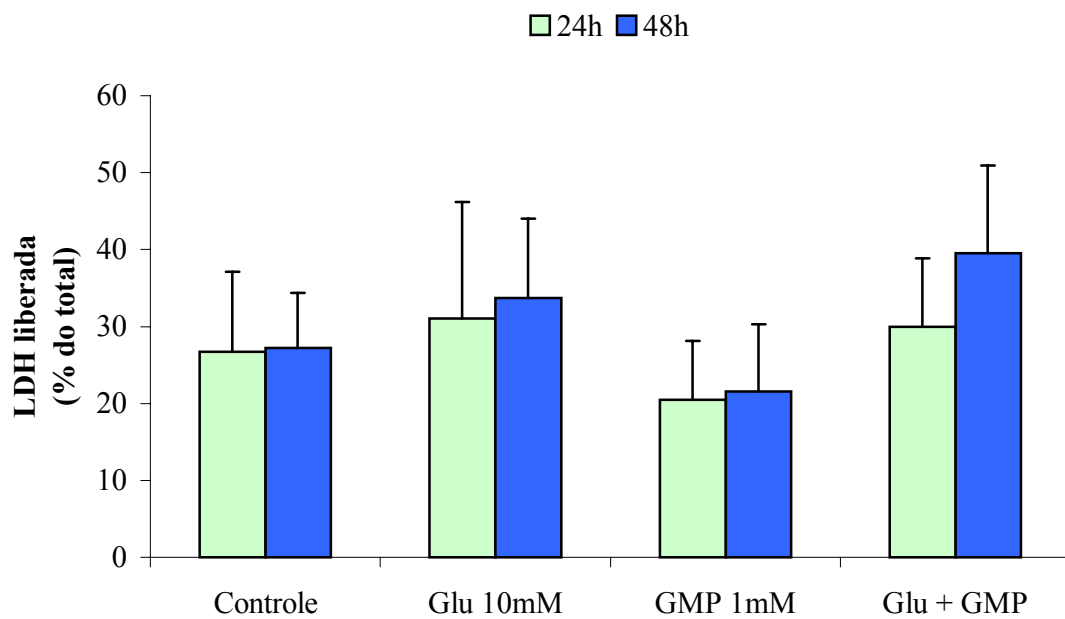


Figura 21: **Efeitos do Glu e do GMP na liberação de LDH em astrócitos em cultura.** Os astrócitos foram tratados com 1 mM de GMP e/ou 10 mM de Glu por 24h ou 48h. A liberação da LDH foi medida como descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

#### 4.2.5 Análise da morfologia celular por contraste de fase:

A análise morfológica por contraste de fase demonstrou inchaço celular após o tratamento dos astrócitos com 10 mM de Glu por 48h (Figura 22G). A adição de 1 mM de GMP ao meio na presença de 10 mM de Glu não reverteu o inchaço celular observado após o tratamento dos astrócitos com 10 mM de Glu, por 48h (Figura 22H).

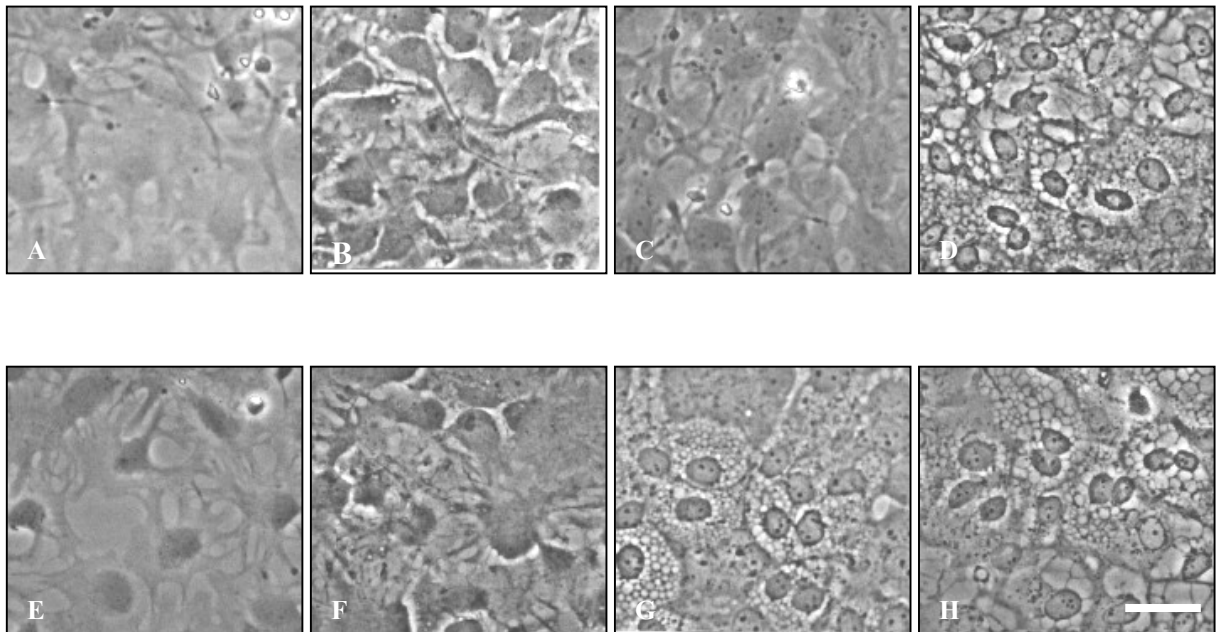


Figura 22: **Fotomicrografias representativas de contraste de fase de astrócitos em cultura tratados com Glu e GMP.** Astrócitos foram observados e fotografados após 24h (painel superior) e 48h (painel inferior) de tratamento, respectivamente com: (A, E) controle; (B, F) GMP 1 mM; (C, G) Glu 10 mM; (D, H) Glu 10 mM + GMP 1 mM. As células apresentaram alterações na morfologia como observado em (D, G e H). Barra = 10  $\mu$ m.

### **4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO DOS ASTRÓCITOS COM GMP OU GUO SOBRE NEURÔNIOS EM CO-CULTURA:**

#### **4.3.1 Avaliação dos efeitos do pré-tratamento de astrócitos cerebelares com GMP ou GUO, por 24h, sobre o número de neurônios em co-cultura:**

Após o tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO por 24h, neurônios foram plaqueados sobre a monocamada astrocitária. Após 24h, as células foram fixadas e foi realizada imunocitoquímica contra a  $\beta$ -tubulina III, uma proteína encontrada apenas em neurônios (MARTINEZ & GOMES, 2002), e o número total de neurônios e o número de neuritos por neurônio foram contados. Utilizamos também GUO, o nucleosídeo da guanina, devido as evidências prévias relatando efeitos tróficos para os nucleosídeos e nucleotídeos da guanina (KIM et al., 1991; RATHBONE et al., 1999; CICCARELLI et al., 2001).

Nas Figuras 23, 24 e 25, observa-se que após 24h há um aumento significativo no número de neurônios sobre a monocamada de astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO nas concentrações de 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM. Este aumento no número de neurônios corresponde a 160 %, 103 % e 151 % quando os astrócitos são pré-tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP, e a 116 %, 154 % e 139 % quando pré-tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GUO, respectivamente. Estes valores correspondem à média de  $138 \pm 30$  % e  $136 \pm 19$  % quando os astrócitos são pré-tratados com GMP ou GUO, respectivamente.

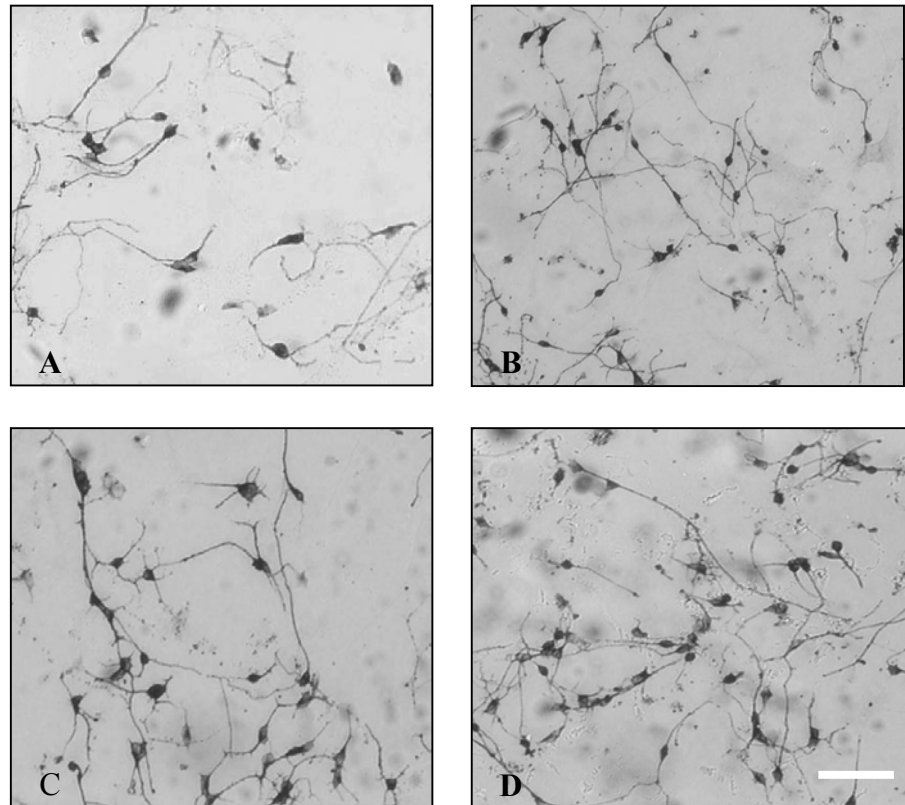


Figura 23: **Fotomicrografias representativas do efeito do pré-tratamento de astrócitos com GMP sobre o número de neurônios co-cultivados por 24h.** Os astrócitos foram tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP, por 24h. Os neurônios foram plaqueados e após 24h fixados para realização da imunocitpquímica anti- $\beta$ -tubulina III. (A) Controle; (B) GMP 1  $\mu$ M; (C) GMP 100  $\mu$ M e (D) GMP 1 mM. Barra = 20  $\mu$ m.

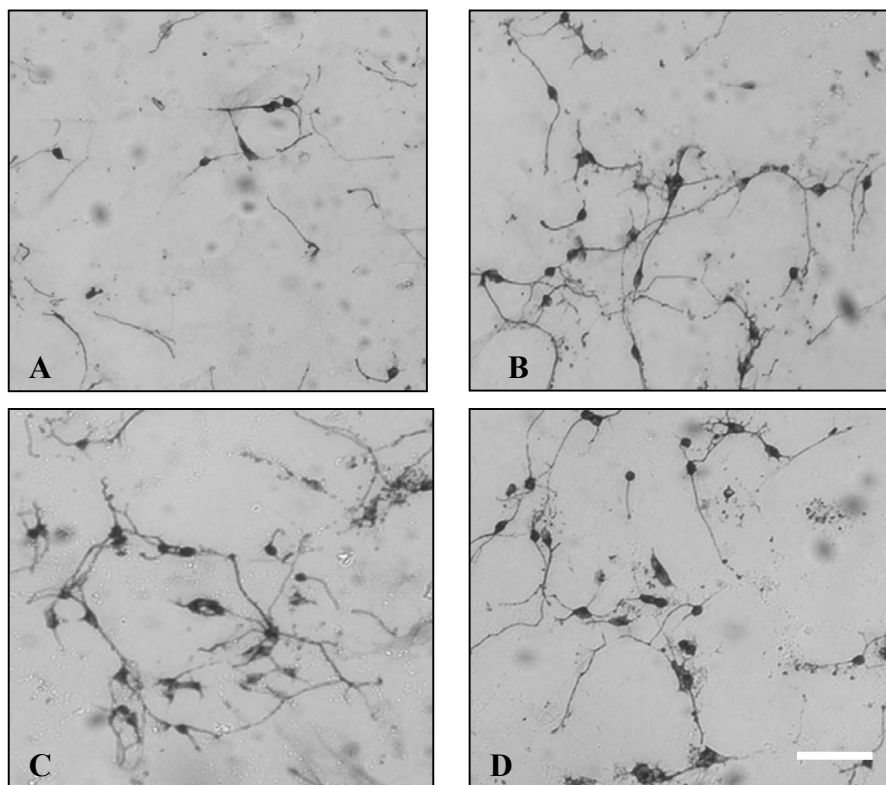


Figura 24: **Fotomicrografias representativas do efeito do pré-tratamento de astrócitos com GUO sobre o número de neurônios co-cultivados por 24h.** Os astrócitos foram tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GUO, por 24h. Os neurônios foram plaqueados e após 24h fixados para realização da imunocitpquímica anti- $\beta$ -tubulina III. (A) Controle; (B) GUO 1  $\mu$ M; (C) GUO 100  $\mu$ M e (D) GUO 1mM. Barra = 20  $\mu$ m.

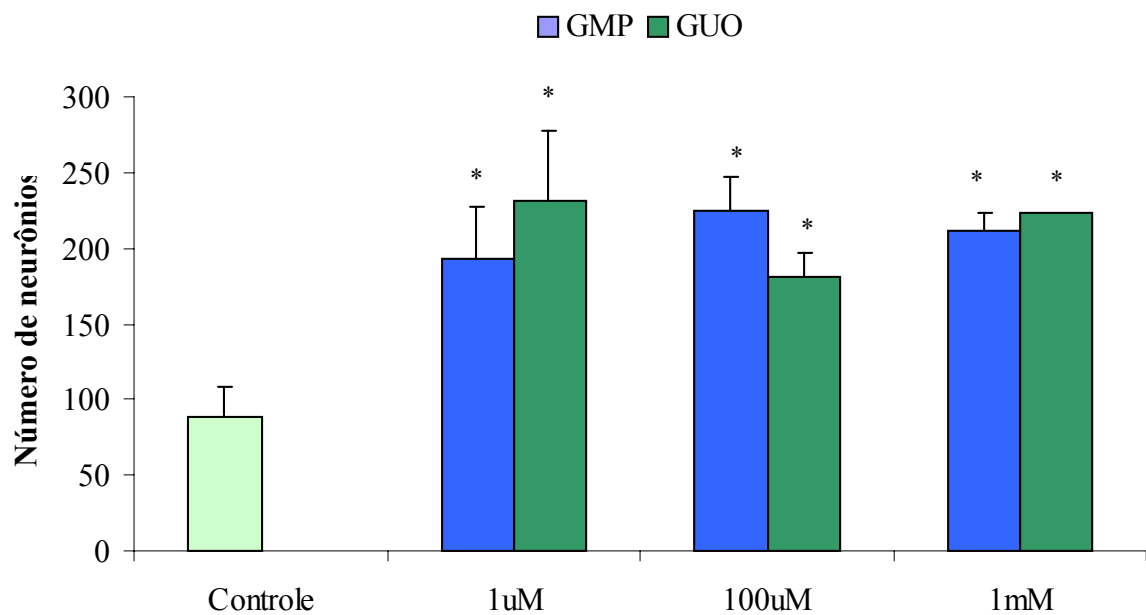


Figura 25: **Número de neurônios observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO por 24h.** Os astrócitos foram tratados com GMP ou GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), por 24h. Os neurônios foram plaqueados e após 24h fixados para realização da imunocitoquímica anti- $\beta$ -tubulina III e contados conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicatas.



#### **4.3.2 Avaliação dos efeitos do pré-tratamento de astrócitos cerebelares com GMP ou GUO, por 24h, sobre o número de neuritos por neurônios em co-cultura:**

Nas Figuras 26 e 27, observa-se que o pré-tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO por 24h, não alterou o número de neuritos por neurônio em nenhuma das concentrações utilizadas. Observa-se ainda, que a maior parte dos neurônios possui três ou mais neuritos, tanto quando plaqueados sobre a monocamada de astrócitos pré-tratada com GMP como com GUO.

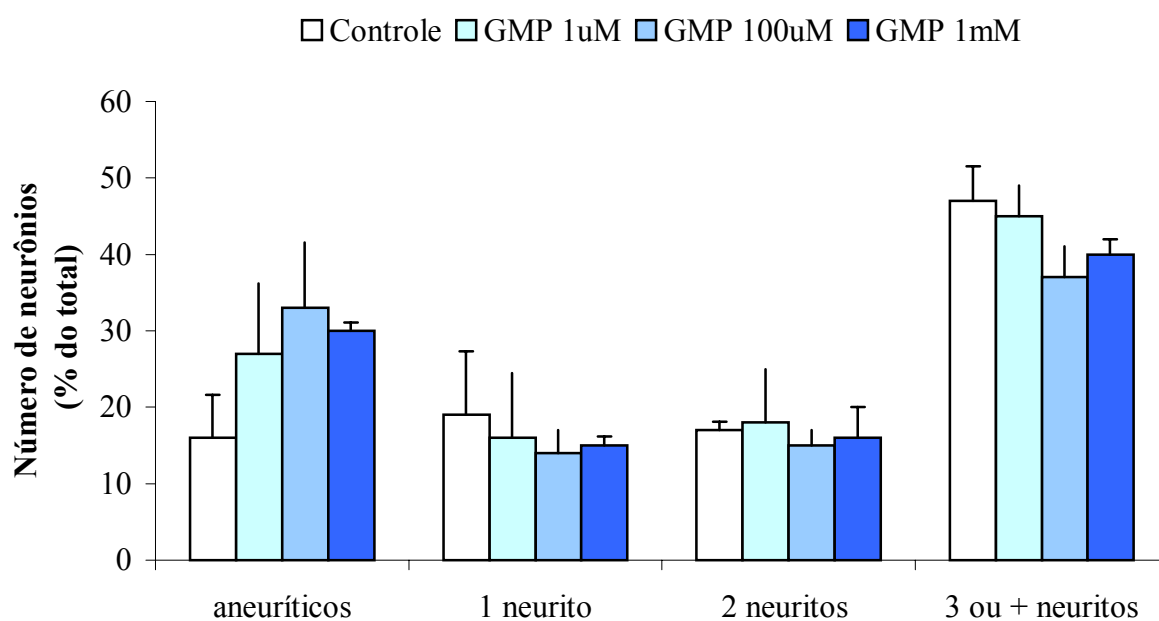


Figura 26: **Número de neuritos por neurônio observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GMP por 24h.** Os astrócitos foram tratados com GMP (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), por 24h. Os neurônios foram plaqueados e após 24h fixados para realização da imunocitoquímica anti- $\beta$ -tubulina III e o número de neuritos por neurônio foi contado conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

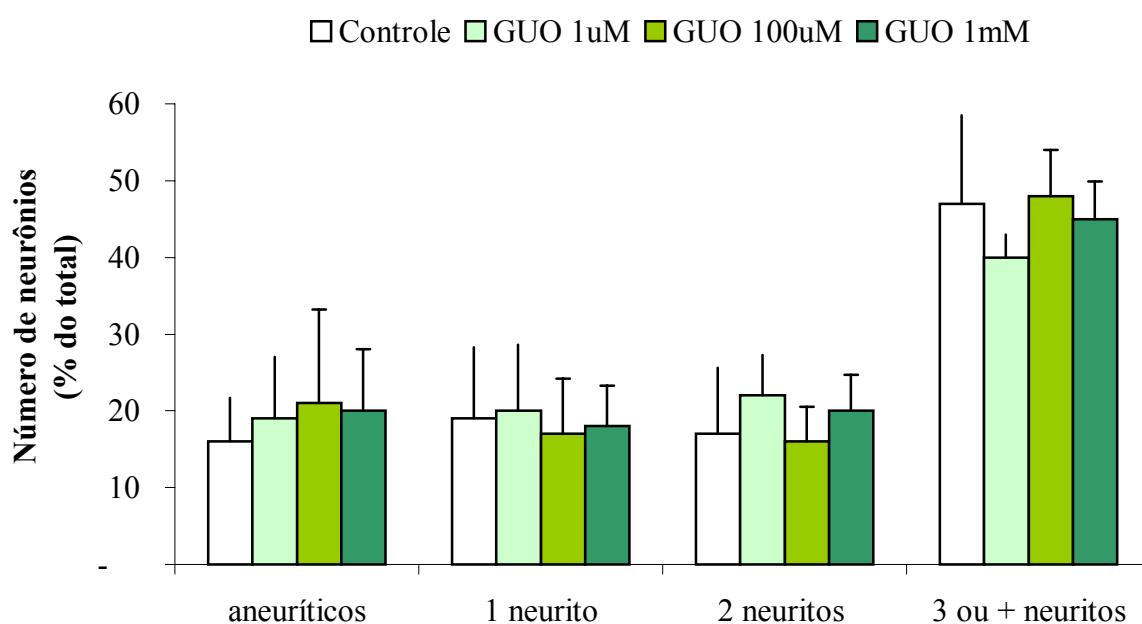


Figura 27: **Número de neuritos por neurônio observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GUO por 24h.** Os astrócitos foram tratados com GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), por 24h. Os neurônios foram plaqueados e após 24h fixados para realização da imunocitoquímica anti- $\beta$ -tubulina III e o número de neuritos por neurônio foi contado conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

#### 4.3.3 Avaliação dos efeitos do pré-tratamento de astrócitos cerebelares com GMP ou GUO, por 24h, sobre o comprimento total dos neuritos de neurônios em co-cultura:

Na Figura 28, foi avaliado o comprimento total dos neuritos, após 24h de cultivo dos neurônios sobre a monocamada de astrócitos pré-tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP ou GUO, por 24h. Verifica-se que o pré-tratamento dos astrócitos não alterou o comprimento total dos neuritos em nenhuma das condições analisadas.

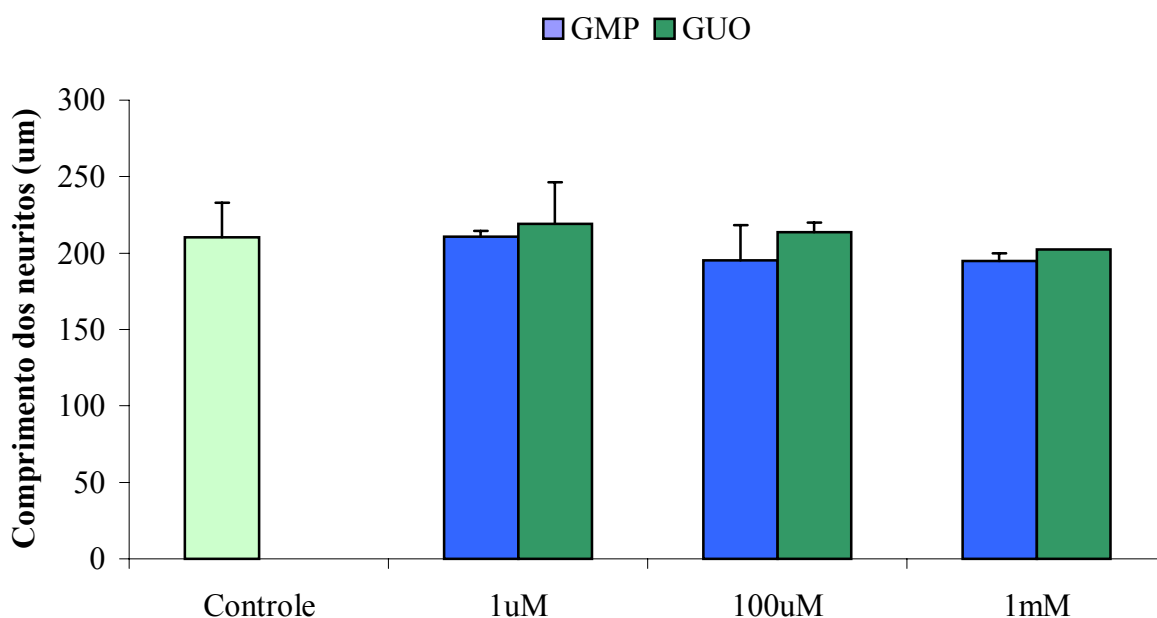
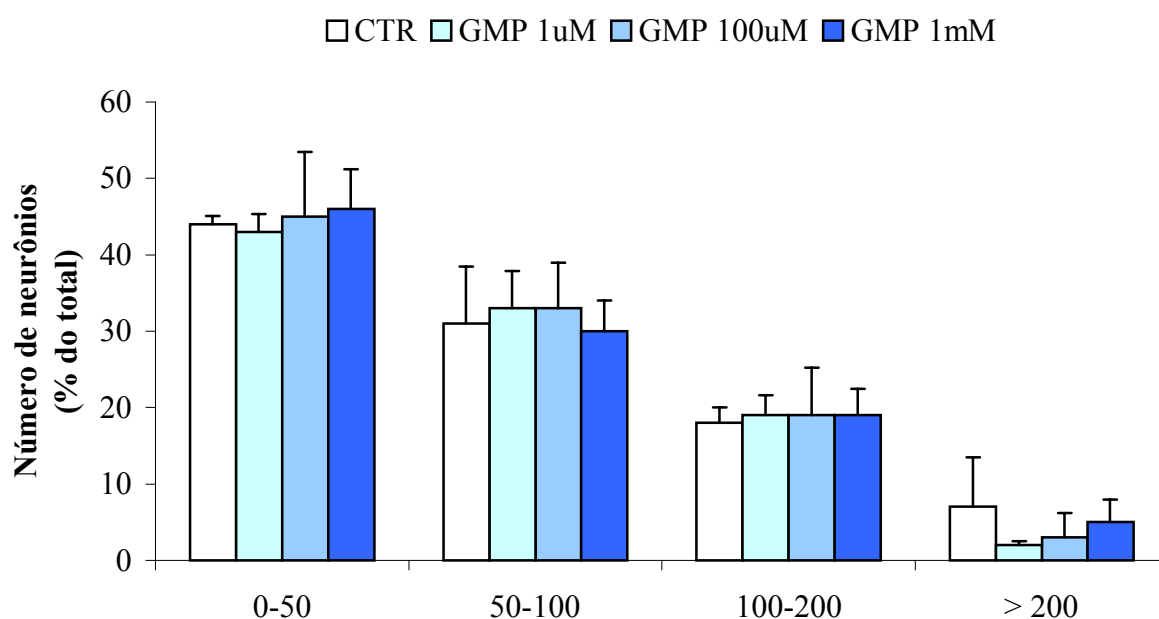


Figura 28: **Comprimento total dos neuritos de neurônios observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO por 24h.** Os astrócitos foram tratados com GMP ou GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), por 24h. Os neurônios foram plaqueados e após 24h fixados para realização da imunocitoquímica anti- $\beta$ -tubulina III. O comprimento dos neuritos foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

#### **4.3.4 Avaliação dos efeitos do pré-tratamento de astrócitos cerebelares com GMP ou GUO, por 24h, sobre o comprimento dos neuritos por neurônios em co-cultura:**

Nas Figuras 29 e 30, observa-se que o pré-tratamento dos astrócitos com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP ou GUO por 24h, não alterou o comprimento dos neuritos por neurônio em nenhuma das concentrações utilizadas, quando comparado ao controle. Observa-se ainda, que a maior parte dos neurônios possuem neuritos com comprimento entre 0 e 100  $\mu$ m, tanto quando plaqueados sobre a monocamada de astrócitos pré-tratada com GMP como com GUO.



**Figura 29: Distribuição dos neurônios por comprimento dos neuritos observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GMP.** Os astrócitos foram tratados com GMP (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), por 24h. Os neurônios foram plaqueados e após 24h fixados para realização da imunocitoquímica anti- $\beta$ -tubulina III. O comprimento dos neuritos foi medido e os neurônios foram separados conforme o comprimento de seus neuritos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

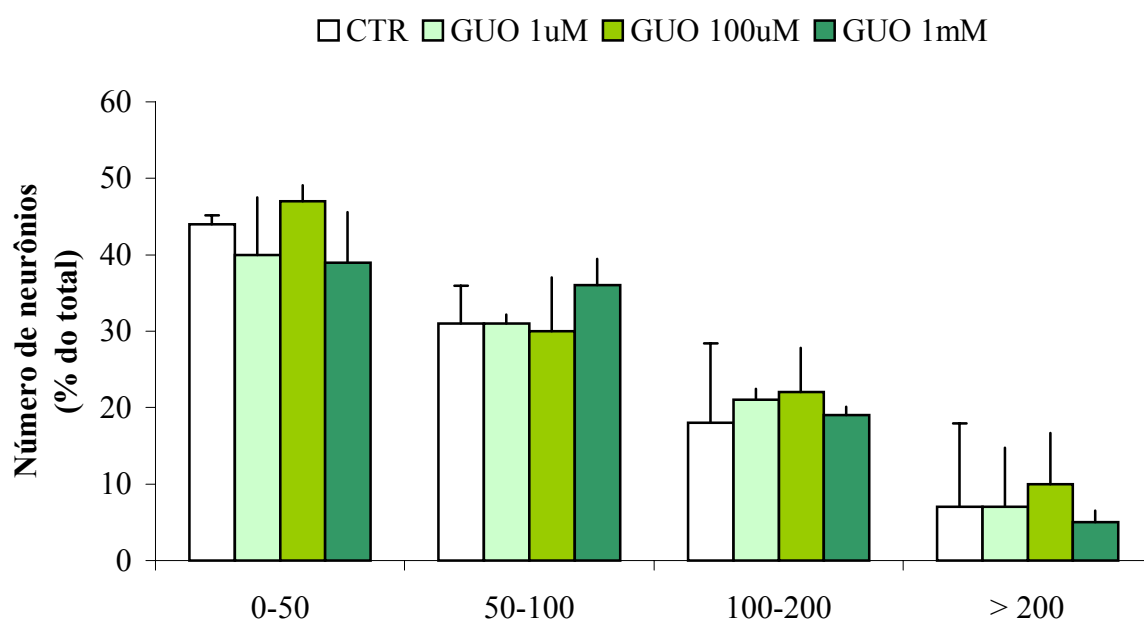


Figura 30: **Distribuição dos neurônios por comprimento dos neuritos observado após 24h de co-cultura sobre astrócitos pré-tratados com GUO.** Os astrócitos foram tratados com GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), por 24h. Os neurônios foram plaqueados e após 24h fixados para realização da imunocitoquímica anti- $\beta$ -tubulina III. O comprimento dos neuritos foi medido e os neurônios foram separados conforme o comprimento de seus neuritos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicatas.

#### **4.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR:**

##### **4.4.1 Avaliação da incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) em astrócitos tratados com GMP ou GUO por 24h:**

Para avaliar os efeitos do GMP e da GUO sobre a proliferação dos astrócitos, utilizou-se a incorporação da BrdU. Na Figura 31, verifica-se que o tratamento dos astrócitos com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP ou GUO por 24h, não altera significativamente o número de células positivas para BrdU, porém em astrócitos tratados com 1 mM de GMP observa-se uma tendência, não significativa, de aumento no número de células positivas para BrdU, quando comparado ao controle.



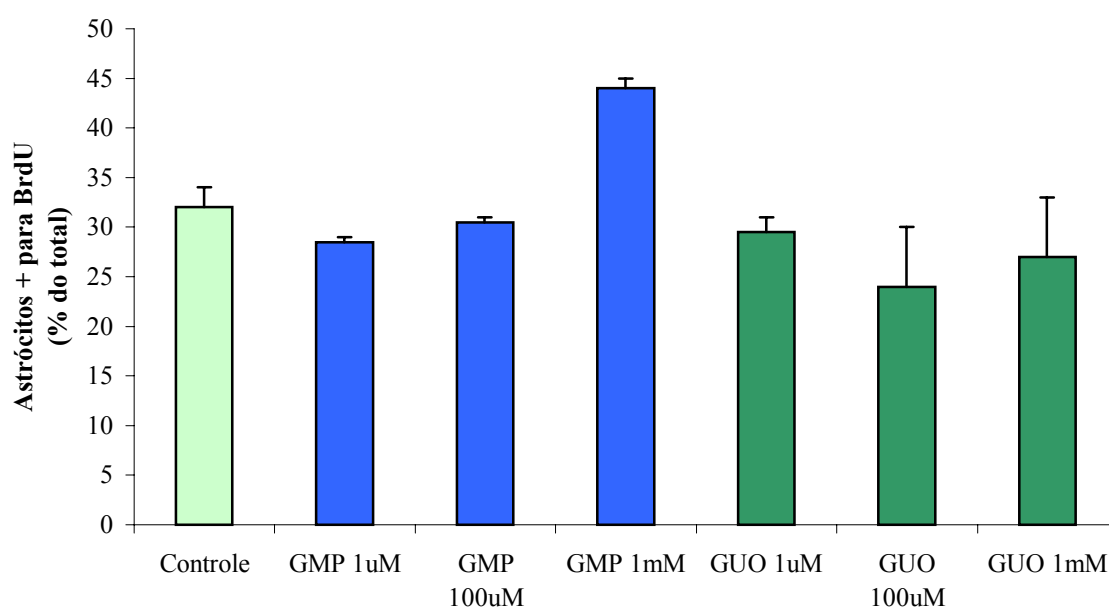
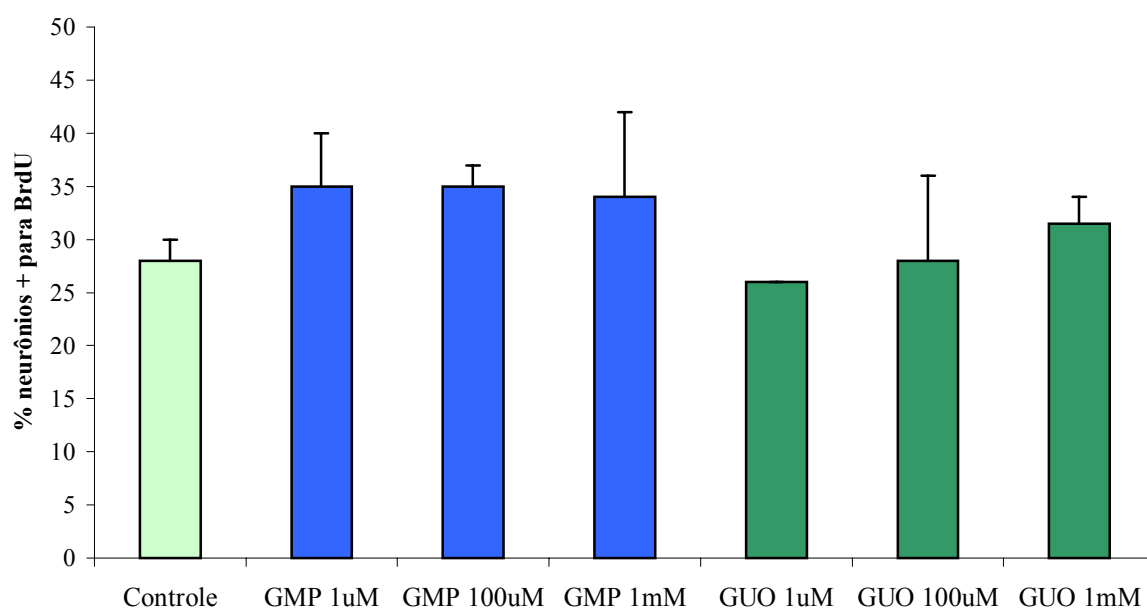


Figura 31: **Efeitos do tratamento de astrócitos com GMP ou GUO, por 24h, na proliferação astrocitária.** Os astrócitos foram tratados com GMP ou GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM) e incubados com BrdU (0,1 mg/ml). Após 24h, os astrócitos foram fixados e a imunocitoquímica anti-BrdU foi realizada como descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos realizados em triplicatas.

#### **4.4.2 Avaliação da incorporação de BrdU em neurônios em co-cultura com astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO por 24h:**

Uma vez que foi observado um aumento significativo no número de neurônios em co-cultura com astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO por 24h, investigou-se se este aumento se deve a proliferação neuronal. Para tanto, utilizou-se a incorporação da BrdU e a marcação dupla da GFAP para descartar os astrócitos que incorporaram a BrdU. Na Figura 32, observa-se que o pré-tratamento dos astrócitos com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP ou GUO por 24h, não altera o número de neurônios positivos para BrdU, demonstrando que o maior número de neurônios observado nas co-culturas com astrócitos tratados com GMP ou GUO, não se deve à proliferação celular.



**Figura 32: Efeitos do pré-tratamento de astrócitos com GMP ou GUO, por 24h, na proliferação de neurônios mantidos em co-cultura.** Os astrócitos foram tratados com GMP ou GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), por 24h. Os neurônios foram plaqueados, incubados com BrdU (0,1 mg/ml) e após 24h fixados para realização da imunocitoquímica anti-BrdU como descrito nos Materiais e Métodos. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos realizados em triplicatas.

#### **4.5 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS APÓS TRATAMENTO COM GMP OU GUO:**

Para investigar os efeitos do GMP e da GUO sobre a morfologia astrocitária, os astrócitos foram tratados com GMP ou GUO na concentração de 1  $\mu$ M por 24h, uma vez que nesta concentração GMP e GUO promoveram um aumento significativo no número de neurônios após 24h em co-cultura e que este aumento permaneceu semelhante quando a concentração do nucleosídeo e nucleotídeo foi aumentada para 100  $\mu$ M ou 1 mM. Os astrócitos foram fixados e a imunocitoquímica contra GFAP foi realizada. A marcação para GFAP demonstrou que o tratamento com GMP ou GUO por 24h, promove uma discreta alteração na morfologia dos astrócitos cerebelares. Na Figura 33, observou-se que após o tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO por 24h, os astrócitos assumiram uma forma protoplasmática, enquanto astrócitos mantidos na situação controle (meio sem soro) apresentaram-se mais fibrosos.

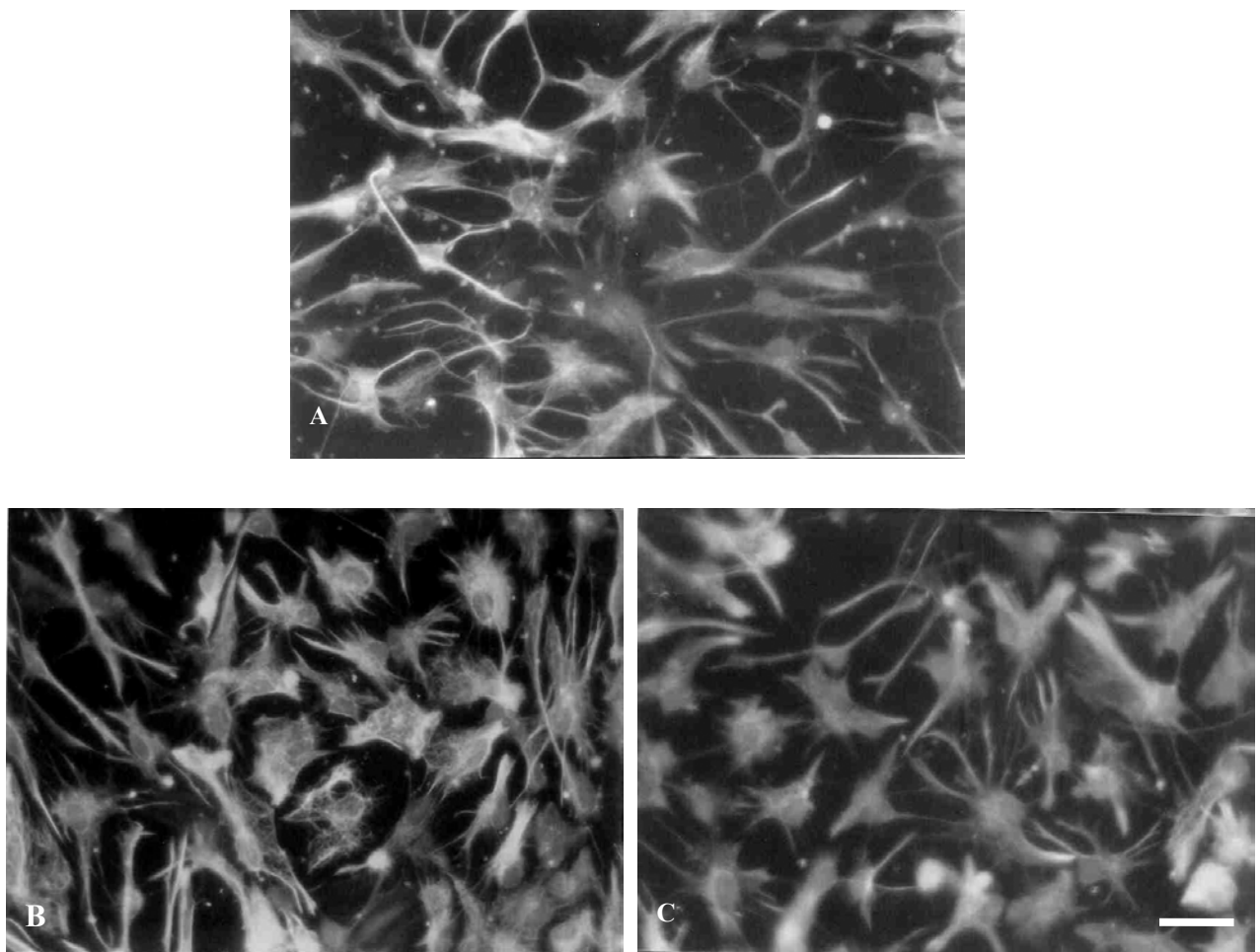


Figura 33: **Efeitos do tratamento de astrócitos com GMP ou GUO, por 24h, na marcação da GFAP.** Os astrócitos foram tratados com GMP ou GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), por 24h, fixados e utilizados para imunocitoquímica anti-GFAP. (A) Controle; (B) GMP 1  $\mu$ M; (C) GUO 1  $\mu$ M. Barra = 20  $\mu$ m.

## **4.6 ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC):**

### **4.6.1 Fibronectina:**

Astrócitos mantidos em meio DMEM-F12 sem soro por 24h (situação controle, Figuras 34A e 34B), apresentam uma marcação pouco intensa para a fibronectina e sua distribuição é puntual. Após o tratamento com GMP ou GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1mM), a marcação para fibronectina apresentou-se mais evidente, com organização fibrilar, indicando uma maior complexidade da MEC (Figuras 34 e 35). Observou-se que o tratamento com GMP aumentou marcação e alterou a organização da fibronectina em todas as concentrações utilizadas, 1  $\mu$ M (Figura 34B), 100  $\mu$ M (Figura 34C) e 1mM (Figura 34D), em relação ao controle (Figura 34A). Entretanto, o tratamento com GUO aumentou marcação e alterou a organização da fibronectina em relação ao controle (Figura 35A), conforme o aumento da concentração de GUO de 1  $\mu$ M (Figura 35B), para 100  $\mu$ M (Figura 35C) e 1mM (Figura 35D). Na Figura 36, observa-se um maior detalhamento da alteração na organização da fibronectina em astrócitos tratados com 1  $\mu$ M de GMP (Figura 36B) ou 1  $\mu$ M de GUO (Figura 36C), em comparação à situação controle (Figura 36A). Resultados semelhantes foram observados quando os astrócitos foram tratados com 10  $\mu$ M de dipiridamole, um inibidor do transportador de nucleosídeos (PARKINSON et al., 2002), 30 minutos antes da incubação dos astrócitos com GMP ou GUO, demonstrando que os efeitos observados sobre a organização da fibronectina são extracelulares (dados não mostrados).

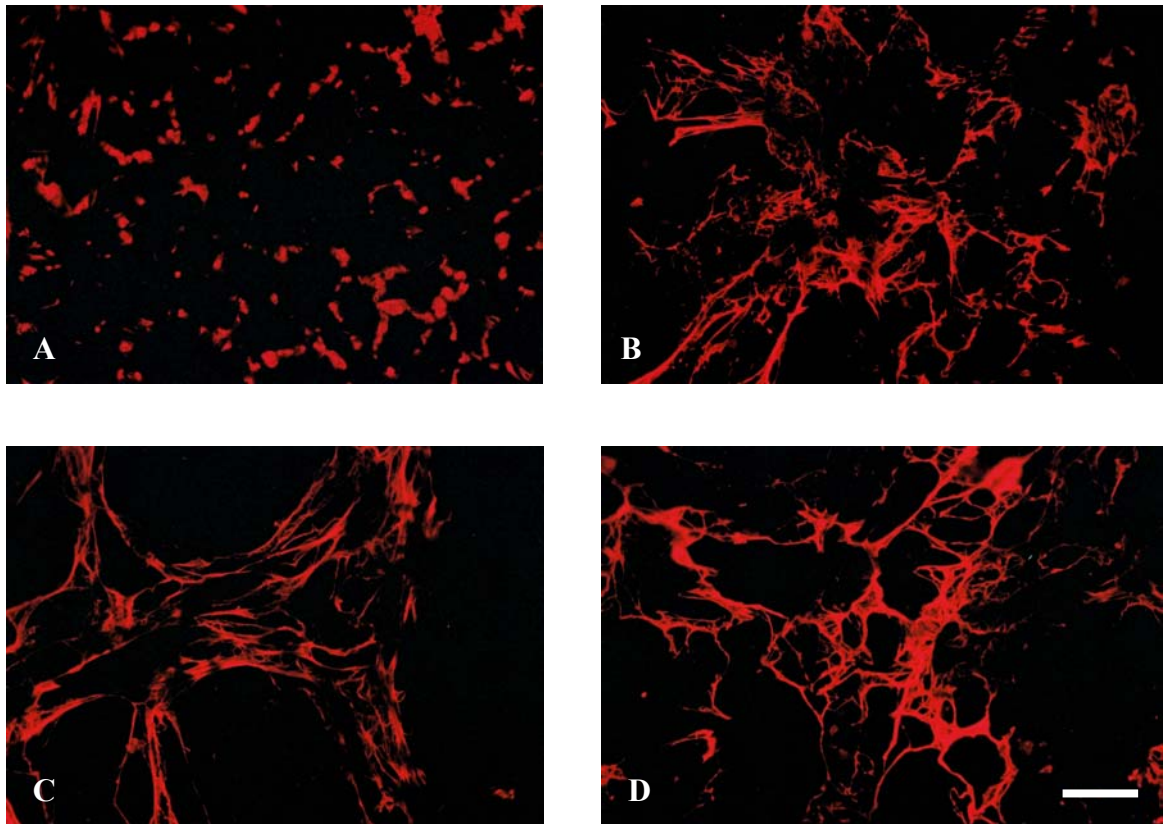


Figura 34: **Efeitos do tratamento de astrócitos com GMP por 24h, sobre a organização da fibronectina.** Os astrócitos foram tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP. Após 24h, as células foram fixadas para realização da imunocitoquímica anti-fibronectina. Fotomicrografias representativas de três experimentos realizados em duplicatas. (A) Controle; (B) GMP 1  $\mu$ M; (C) GMP 100  $\mu$ M e (D) GMP 1 mM. Barra = 20  $\mu$ m.

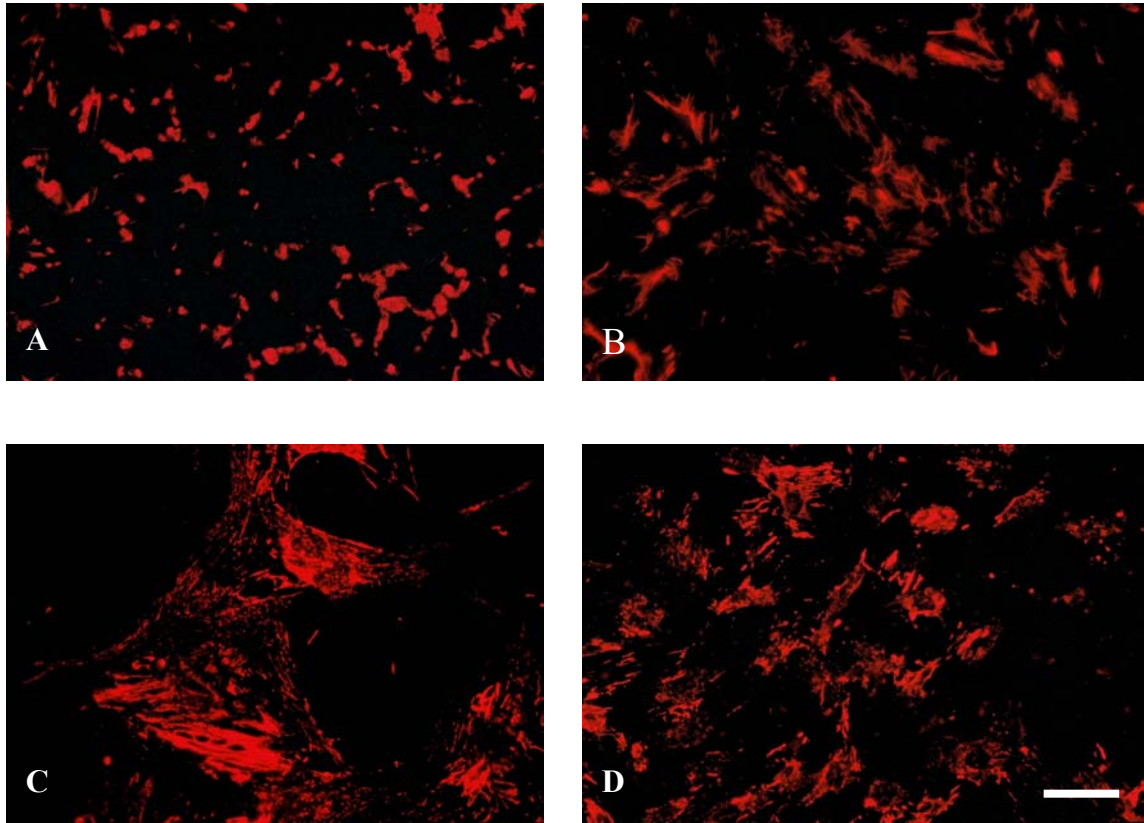


Figura 35: **Efeitos do tratamento de astrócitos com GUO por 24h, sobre a organização da fibronectina.** Os astrócitos foram tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GUO. Após 24h, as células foram fixadas para realização da imunocitpquímica anti-fibronectina. Fotomicrografias representativas de três experimentos realizados em duplicatas. (A) Controle; (B) GUO 1  $\mu$ M; (C) GUO 100  $\mu$ M e (D) GUO 1 mM. Barra = 20  $\mu$ m.



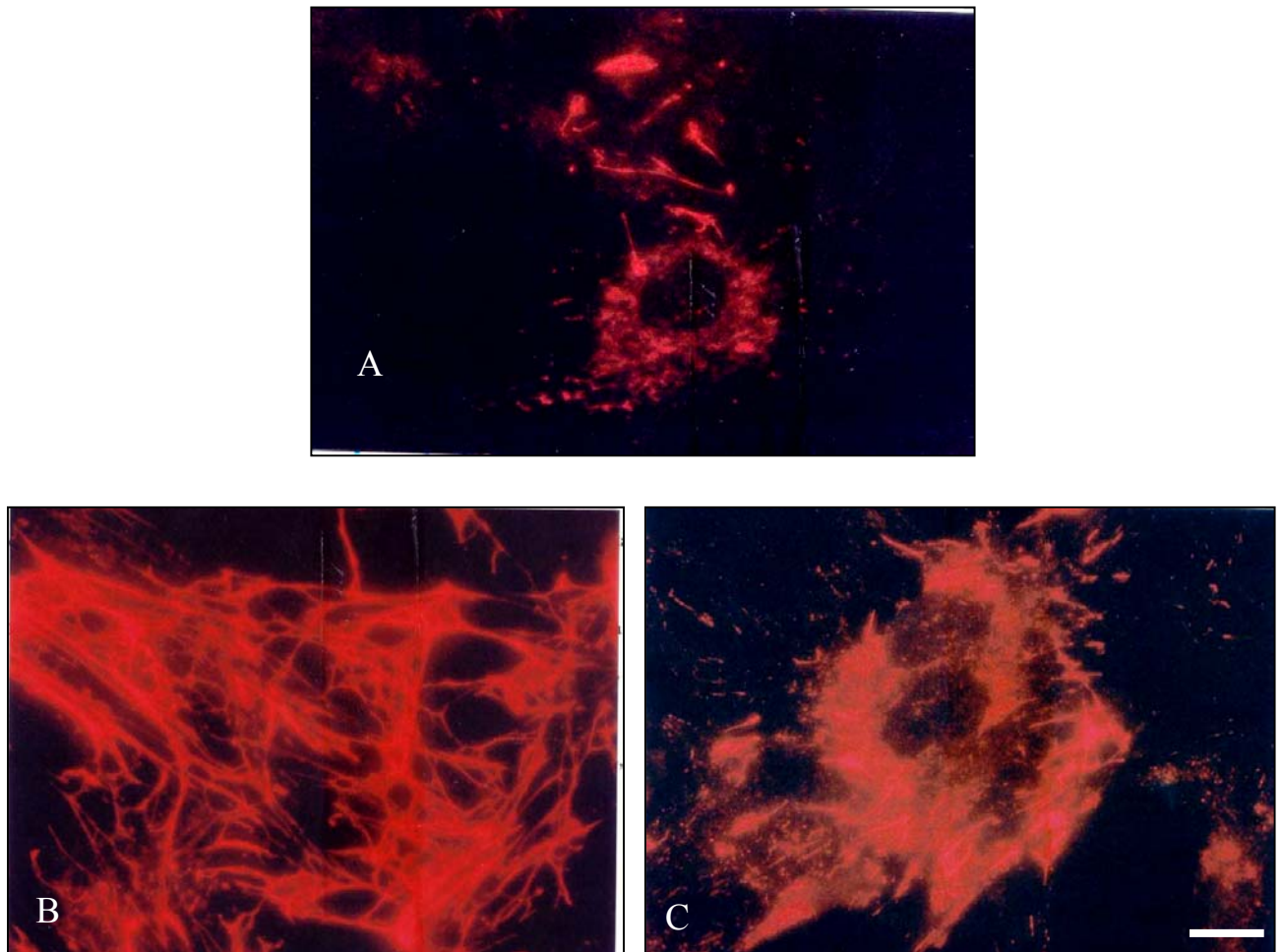


Figura 36: Fotografias representativas das alterações na organização de fibronectina em astrócitos tratados com GMP ou GUO por 24h. Detalhamento observado em aumento de 1.000 X em astrócitos tratados com 1  $\mu$ M de GMP ou GUO. Após 24h, as células foram fixadas para realização da imunocitoquímica anti-fibronectina. (A) Controle; (B) GMP 1  $\mu$ M e (C) GUO 1  $\mu$ M. Barra = 8  $\mu$ m.

#### 4.6.2 Laminina:

A imunofluorescência para laminina demonstrou que em astrócitos mantidos nas condições de controle, essa proteína apresentou uma marcação pouco intensa, com distribuição puntual (Figuras 37A e 38A). Após o tratamento com GMP ou GUO (1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM), a marcação para laminina apresentou-se mais evidente, com organização fibrilar, indicando uma maior complexidade da MEC (Figuras 37 e 38). Observou-se que GMP promoveu alterações na organização da laminina, que passa de puntual para fibrilar, de acordo com o aumento da sua concentração, de 1  $\mu$ M (Figura 37B), para 100  $\mu$ M (Figura 37C) e 1 mM (Figura 37D). Quando os astrócitos são tratados com GUO, observou-se alteração na organização da laminina na menor concentração, 1  $\mu$ M (Figura 38B), que se manteve com o aumento da concentração para 100  $\mu$ M (Figura 38C) e 1 mM (Figura 38D).

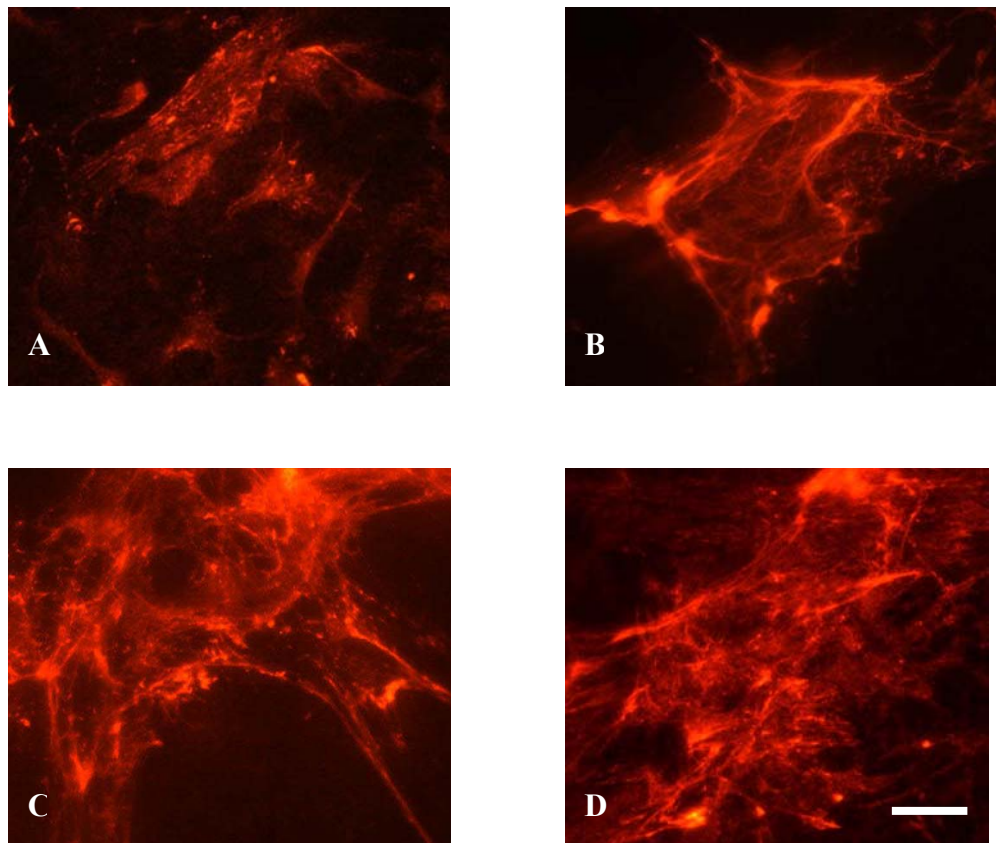


Figura 37: **Efeitos do tratamento de astrócitos com GMP por 24h, sobre a organização da laminina.** Os astrócitos foram tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP. Após 24h, as células foram fixadas para realização da imunocitpquímica anti-laminina. Fotomicrografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. (A) Controle; (B) GMP 1  $\mu$ M; (C) GMP 100  $\mu$ M e (D) GMP 1 mM. Barra = 20  $\mu$ m.

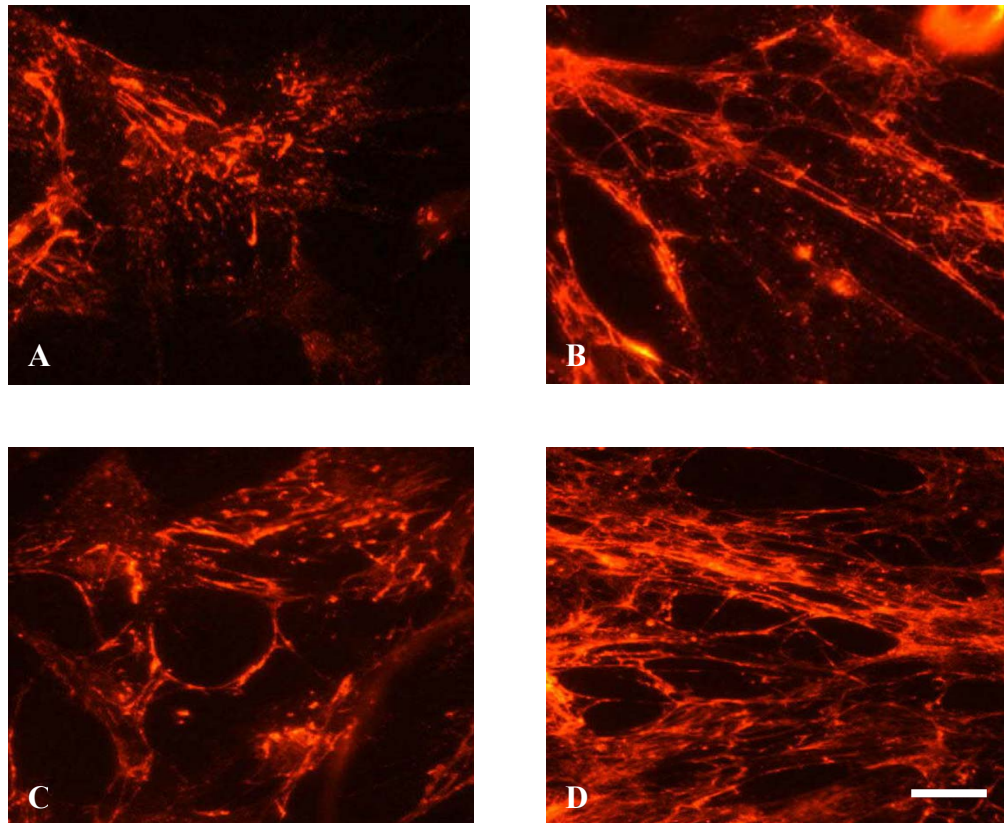


Figura 38: **Efeitos do tratamento de astrócitos com GUO por 24h, sobre a organização da laminina.** Os astrócitos foram tratados com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GUO. Após 24h, as células foram fixadas para realização da imunocitpquímica anti-laminina. Fotomicrografias representativas de dois experimentos realizados em duplicatas. (A) Controle; (B) GUO 1  $\mu$ M; (C) GUO 100  $\mu$ M e (D) GUO 1 mM. Barra = 20  $\mu$ m.

## **5.0. DISCUSSÃO**

### **5.1. CARACTERIZAÇÃO E MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS:**

A GFAP faz parte do citoesqueleto celular, sendo um filamento intermediário expresso quase que exclusivamente em astrócitos, além de ser um marcador de diferenciação astrocitária (PERZEL'OVA & MARES, 1993; MORITA et al., 1997; KÁLMÁN & AJTAI, 2001). Para verificar se as culturas celulares correspondiam a culturas de astrócitos, foi realizada a imunofluorescência para GFAP. Em comparação aos núcleos totais corados com Hoescht 33342, observou-se que aproximadamente 95 % das células eram positivas para GFAP, correspondendo a astrócitos (Figura 7).

### **5.2 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR:**

A recaptação de glutamato do espaço extracelular é essencial para diminuir as correntes pós-sinápticas excitatórias (AUGER & ATTWELL, 2000) e prevenir a morte excitotóxica decorrente da super estimulação dos receptores glutamatérgicos (ROTHSTEIN et al., 1996). Os principais responsáveis pela retirada do glutamato da fenda sináptica são os astrócitos (NEDERGAARD et al., 2002). Assim, uma vez danificados, haverá uma redução nas suas funções, o que pode levar a danos no SNC e desencadear patologias atribuídas a excitotoxicidade de aminoácidos excitatórios (CHEN et al., 2000).

Neste trabalho, demonstrou-se que o tratamento de astrócitos cerebelares com 1 mM ou 10 mM de Glu, por 24h ou 48h, não induziu apoptose, avaliada através da coloração da cromatina com Hoescht 33342 (Figura 9).

CHEN et al. (2000), demonstraram que a estimulação de astrócitos com Glu (1 e 10 mM) resulta em inchaço celular e acúmulo da LDH no meio extracelular. O tratamento das células com 10 mM de Glu, por 24h ou 48h, ocasionou um leve aumento, não significativo, na liberação da enzima quando comparada ao grupo controle (Figura 15).

Observou-se ainda, um aumento significativo no número de células necróticas, após o tratamento com 10 mM de Glu por 48h, quando comparado aos grupos controle e Glu 1 mM 48h, e ao grupo Glu 10 mM, 24h (Figura 14). A análise morfológica por contraste de fase demonstrou inchaço celular após o tratamento dos astrócitos com 10 mM de Glu por 48h.

A ação tóxica do glutamato em astrócitos corticais em cultura foi descrita em duas fases por CHEN et al. (2000). Ocorre inchaço celular e nuclear observado entre 4-6h após o insulto com Glu (1 ou 10 mM). As alterações morfológicas e bioquímicas características de morte celular são observadas após 16-18h de exposição ao Glu e quase todas as células morrem após 24-30h. Os astrócitos cerebelares parecem seguir o mesmo padrão de toxicidade, porém em tempos relativamente mais longos que os astrócitos corticais. Com 24h de exposição a 10 mM de Glu houve uma tendência ao aumento da liberação da LDH, porém alterações morfológicas como o inchaço celular já foram observadas. Com 48h de exposição a 10 mM de Glu observou-se inchaço celular e as células foram marcadas com PI, indicando morte por necrose, demonstrando assim, que astrócitos cerebelares são mais resistentes à toxicidade induzida pelo glutamato do que astrócitos corticais. A constatação de que após 48h de tratamento não há redução significativa no número de astrócitos em cultura (Figura 8), reforça esta observação.

Supõe-se que esta resistência dos astrócitos cerebelares ao insulto com glutamato seja devido às diferenças na vulnerabilidade destas células ao mecanismo de morte celular

excitotóxico de uma região para outra do SNC (MATUTE et al., 2002). PRIETO & ALONSO (1999), demonstraram que a exposição prolongada de culturas de astrócitos hipotalâmicos a altas concentrações de Glu e agonistas dos receptores AMPA/Kainato não afeta a viabilidade destas células. No entanto, DAVID et al. (1996), observaram que insultos similares são nocivos a astrócitos neocorticais. Assim, astrócitos cerebelares parecem ser mais resistentes aos insultos com altas concentrações de glutamato por tempo prolongado.

Os DG têm sido descritos como neuroprotetores frente a insultos induzidos por glutamato, tanto *in vivo* (MALCON et al., 1997; SCHMIDT et al., 2000; LARA et al., 2002) como *in vitro* (FRIZZO et al., 2001; REGNER et al., 1998; MOLZ et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

Entretanto, a adição de 1 mM de GMP juntamente com 10 mM de Glu, por 24h ou 48h, não alterou o aumento na liberação da LDH dos astrócitos (Figura 21). Além disso, o inchaço celular observado quando os astrócitos foram tratados com 10 mM de Glu por 48h, não foi revertido quando 1 mM de GMP foi adicionado ao meio juntamente com 10 mM de Glu, levando-nos a sugerir que o GMP não está protegendo os astrócitos cerebelares do dano celular induzido pelo glutamato (Figura 22).

Quando incubado sozinho, o GMP não causou apoptose ou necrose nos astrócitos cerebelares (Figuras 10, 16, 17 e 22). Estes resultados sugerem que o GMP não apresenta ação tóxica em astrócitos cerebelares. Entretanto, em nosso laboratório, foi demonstrado que GMP (1 mM) induz um aumento na fragmentação do DNA promovida por Glu (1 mM e 10 mM) em fatias de hipocampo de ratos, sugerindo que GMP pode induzir apoptose. Demonstrou-se ainda, que 5 mM de GMP sozinho promove redução na viabilidade celular das fatias hipocâmpais (MOLZ et al., 2003). Além disso, CICCARELLI et al. (2000), demonstraram que GUO estimula a liberação de adenosina em astrócitos e já foi observado

que em células astrogliais, ADO pode induzir morte celular por apoptose (ABRACCHIO et al., 1995; ABRACCHIO et al., 1998), sugerindo uma via de atuação da GUO como um agente indutor de apoptose.

Assim, neste estudo observou-se que o GMP não protegeu os astrócitos cerebelares contra a toxicidade do glutamato e também não acentuou o efeito tóxico observado com o tratamento com glutamato. CHEN et al. (2000), descreve que a toxicidade do glutamato em astrócitos corticais é devida ao inchaço celular e redução dos níveis de glutatona e este efeito não é devido a interação com receptores de glutamato, mas sim com os transportadores. Considerando que o efeito neuroprotetor do GMP ocorre via antagonismo aos receptores de glutamato, (MONAHAN et al., 1988; SOUZA & RAMÍREZ, 1991; PAZ et al., 1994; PAAS et al., 1996; DEV et al., 1996, TASCA et al., 1999a; BURGOS et al., 1998), este poderia ser um dos motivos pelo qual o GMP não protegeu contra a toxicidade do glutamato em astrócitos cerebelares. Além disto, foi demonstrado que GUO, a qual pode ser formada extracelularmente pela hidrólise de GMP (ZIMMERMAN & BRAUN, 1996), aumenta a captação astrocitária de glutamato (FRIZZO et al., 2001). No entanto, apesar destes dois possíveis sítios de ação, GMP não protege astrócitos cerebelares da toxicidade de glutamato.

### **5.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO DOS ASTRÓCITOS COM GMP OU GUO SOBRE NEURÔNIOS EM CO-CULTURA:**

Vários trabalhos têm demonstrado os efeitos tróficos dos DG sobre astrócitos e células PC12 (KIM et al., 1991; RATHBONE et al., 1999; CICCARELLI et al. 2000; GYSBERS et al., 2000; CICCARELLI et al., 2001), entretanto, não foram avaliados os efeitos dos DG sobre a interação entre astrócitos e neurônios.



Com o objetivo de analisar os efeitos do GMP e da GUO sobre a interação entre neurônios e astrócitos cerebelares, tratamos as culturas de astrócitos confluentes com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP ou GUO por 24h e neurônios foram plaqueados sobre a monocamada astrócitária pré-tratada, sendo avaliados após 24h.

Após análise do número de neurônios e de neuritos e do comprimento dos neuritos, observou-se um aumento médio de  $138 \pm 30$  % quando os astrócitos foram pré-tratados com GMP e  $136 \pm 19$  % quando pré-tratados com GUO (Figura 25), porém, não foram observadas alterações no número ou no comprimento dos neuritos (Figuras 26, 27, 28, 29 e 30).

Para verificar se o aumento no número de neurônios sobre as monocamadas de astrócitos tratados com GMP ou GUO se deve ao aumento da proliferação astrócitária ou neuronal, realizamos a imunocitoquímica para BrdU. Os astrócitos são o melhor substrato para neurônios em cultura (RAKIC, 2003), portanto, o aumento do número de astrócitos pode favorecer a adesão e a sobrevida neuronal. Além disso, vários estudos demonstraram que os DG, principalmente GTP e GUO, promovem proliferação e diferenciação celular em astrócitos corticais em cultura (KIM et al., 1991; RATHBONE et al., 1999; CICCARELLI et al., 2000).

No entanto, neste estudo não foi observado aumento na proliferação astrocitária ou neuronal quando os astrócitos foram tratados com GUO ou GMP (Figuras 31 e 32), sugerindo que o aumento no número de neurônios observado após 24h em co-cultura pode ser devido ao aumento da sobrevida neuronal.

Assim, considerando o aumento no número de neurônios observado nas co-culturas com astrócitos tratados com GUO ou GMP e levando-se em conta os efeitos da MEC como substrato de adesão e na diferenciação celular, analisamos a organização das proteínas da MEC, laminina e fibronectina. Os astrócitos são a principal fonte dos componentes da MEC,

incluindo a laminina e a fibronectina, tanto *in vivo* como *in vitro* (GARCIA-ABREU et al., 1995; PALU & LIESI, 2002). O padrão de organização destas proteínas na superfície dos astrócitos fornece ótimo substrato para os neurônios e direciona o crescimento de neuritos (GARCIA-ABREU et al., 1995; FARWELL & DUBORD-TOMASETTI, 1999; TRENTIN & MOURA NETO, 1995).

Após o tratamento dos astrócitos com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP ou GUO por 24h, observou-se que tanto a laminina como a fibronectina apresentaram suas organizações em fibras, enquanto astrócitos controle apresentaram uma distribuição puntual das proteínas (Figuras 34, 35, 36, 37 e 38).

A alteração na organização da laminina, do padrão puntual para a forma fibrilar após o tratamento dos astrócitos com GMP, pareceu ser dependente da concentração de GMP utilizada, quanto maior a concentração utilizada, maior a formação das fibras (Figura 37). O mesmo aconteceu com a organização da fibronectina quando os astrócitos foram tratados com GUO, parece que quando maior a concentração de GUO utilizada, maior a formação das fibras (Figura 35).

Estes resultados sugerem vias diferentes de modulação da organização das proteínas da MEC, laminina e fibronectina, frente ao tratamento de astrócitos cerebelares com GMP ou GUO.

Além disso, quando analisamos a organização do citoesqueleto dos astrócitos após o tratamento com GMP ou GUO, através da marcação da GFAP, observamos uma discreta alteração na morfologia destas células (Figura 33). Após o tratamento, os astrócitos apresentaram-se predominantemente na forma protoplasmática, enquanto que nas culturas controle, apresentam-se mais fibrosos. Assim, através da alteração na morfologia astrócitária, GMP e GUO podem estar alterando também as proteínas da MEC, laminina e fibronectina.

Vários estudos demonstraram que a fibronectina participa de processos como a adesão, expansão e migração celular (YONEDA et al., 1995; WALKER & GALLAGHER, 1996), e que interações entre a matriz de fibronectina e fatores de crescimento podem regular a diferenciação e a migração celular (SCHWARZBAUER & SECHLER, 1999). Além disso, a laminina possui um importante papel no crescimento de neuritos, sobrevivência e migração neuronal (LETOURNEAU et al., 1994; GARCIA-ABREU et al., 1995).

A razão pela qual não foi observado aumento no comprimento dos neuritos pode ser devido ao fato de que, de um lado a laminina estava favorecendo o crescimento dos neuritos (LUKENBILL-EDDS, 1997) e do outro a fibronectina estava atuando para diminuir a velocidade do crescimento do cone neuronal (KUHN et al., 1995), não havendo assim, aumento do crescimento de neuritos. No entanto, fibronectina e laminina aumentando a adesão e a sobrevivência dos neurônios cerebelares plaqueados sobre os astrócitos tratados com GMP ou GUO por 24h, podem ser de fundamental importância para o aumento do número de neurônios observado.

Além disso, vários trabalhos têm demonstrado que as moléculas da MEC podem se unir a fatores de crescimento presentes no SNC e regular sua difusão, estabilidade e atividade (VENSTONM & REICHARDT, 1993; ALVAREZ-SILVA et al., 1996; DAMSKY & ILIC, 2002). Sendo os astrócitos a maior fonte de fatores tróficos do SNC (GOMES et al, 1999), devemos considerar que além da modulação das proteínas da MEC, GMP e GUO podem estar estimulando a síntese e produção de fatores tróficos, os quais, agindo autócrina ou paracrinamente, levam a um aumento na sobrevivência neuronal.

Trabalhos recentes têm demonstrado a interação de fatores tróficos com as integrinas, receptores das proteínas da MEC. Neste trabalho, as alterações observadas na organização da LN e da FN podem estar relacionadas com um aumento na liberação de

alguns destes fatores, como o FGF, o EGF, ou a proteína S100 $\beta$ , após o tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO. GLASKY et al. (1996) observaram que a administração de AIT-082, um derivado das purinas, aumenta os níveis de RNA mensageiro para bFGF em regiões lesionadas do cérebro. TRENTIN et al. (2003), demonstraram que o bFGF promove alteração na organização das proteínas da MEC, laminina e fibronectina, semelhante ao observado neste trabalho, o que pode sugerir que o efeito de GUO e GMP possa ocorrer via liberação de fatores tróficos

Além disso, tem sido demonstrado que outros fatores, como o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), o NGF, a NT-3 e a proteína S100 $\beta$ , são liberados após o tratamento com GTP, GUO ou AIT-082 (MIDDLEMISS et al., 1995; NEARY et al., 1996; GYSBERS & RATHBONE, 1996; CROCKER et al., 1997; RATHBONE et al., 1999), porém ainda não foi demonstrado se estes fatores exercem alguma modulação sobre a organização das proteínas da MEC.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o GMP não protege os astrócitos cerebelares da toxicidade induzida pelo glutamato e que astrócitos cerebelares apresentam um perfil de morte necrótica e não apoptótica, quando submetidos a glutamato.

Além disso, a análise dos efeitos dos DG sobre a interação neurônio/glia demonstrou que GMP e GUO atuam na modulação da organização das proteínas da MEC, que por sua vez podem estar aumentando a adesão e sobrevivência neuronal.

## 6.0. CONCLUSÕES

Glutamato não induziu apoptose em astrócitos cerebelares após 24h ou 48h em cultura, porém foi observada indução de necrose após 48h de tratamento das células com 10 mM de Glu.

O GMP não protegeu os astrócitos contra a toxicidade induzida por glutamato.

O tratamento dos astrócitos com GMP não induziu necrose nem apoptose nas células.

O tratamento de astrócitos cerebelares em cultura com 1  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ou 1 mM de GMP ou GUO por 24h, promoveu uma discreta alteração na morfologia das células.

O número de neurônios após 24h em co-cultura com astrócitos tratados com GMP ou GUO, aumentou em média 138 % e 136 %, respectivamente.

Não ocorreram alterações no número de neuritos por neurônio ou no comprimento dos neuritos após 24h de co-cultura com astrócitos tratados com GMP ou GUO.

GMP e GUO não alteraram a proliferação de astrócitos e de neurônios.

A organização das proteínas da MEC, laminina e fibronectina, foi alterada da forma puntual para a forma fibrilar, após o tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO.

Assim, através das alterações na organização da laminina e da fibronectina, GMP e GUO podem estar aumentando a adesão e sobrevivência de neurônios cerebelares em co-cultura.

## 7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn. J Pharmacol.* 78: 114-143, 1998.
- ABRACCHIO, M.P.; CERUTI, S.; BARBIERI, D.; FRANCESCHI, C.; MALONI, W.; BIONDO, L.; BURNSTOCK, G.; CATTABENI, F. A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 213: 908-915, 1995.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. *Garland Science*. 4ed.1463p., 2002.
- ALEXANIAN, A. R. & BAMBURG, J. R. Neuronal survival activity of S100 $\beta$  betabeta is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-kappaB. *FASEB J.* 13: 1611-1620, 1999.
- ALVAREZ-SILVA, M. & BOROJEVIC, R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-3 (IL-3) activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma-associated heparan sulfate proteoglycans. *J.Leuk.Biol.* 59:435-441, 1996.
- ANKARCRONA, M. Glutamate induced cell death: apoptosis or necrosis? *Progr. Brain Res.* 116: 266-272, 1998.
- ANKARCRONA, M.; DYPBURKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHYVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973, 1995.
- AUGER, C. & ATTWELL, D. Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters. *Neuron* 28: 547-558, 2000.
- BAKER, A. J.; ZORNOW, M. H.; SCHELLER, M. S.; YAKSH, T. L.; SKILLING, S. R.; SMULLING, D. H.; LARSON, A. A. & KUCZENSKI, R. Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. *J. Neurochem.* 57: 1370-1379, 1991.
- BALÁZS, R.; MILLER, S.; ROMANO, C.; VRIES, A.; CHUN, Y. & COTMAN, C. W. Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulations. *J. Neurochem.* 69: 151-163, 1997.
- BANASIAK, K. J.; CRONIN, T. & HADDAD, G. G. Bcl-2 prolongs neuronal survival during hypoxia-induced apoptosis. *Mol. Brain Res.* 72: 214-225, 1998.

- BARRES, B. A. & BRADE, Y. Neuronal and glial cell biology. *Curr. Opin. Neurob.* 10: 642-648, 2000.
- BHATTACHARYYA, A.; OPPENHEIM, R. W.; PREVETTE, D.; MOORE, B. W.; BRACKENBURY, R. & RATNER, N. S100 is present in developing chicken neurons and schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J. Neurobiol.* 23: 451-466, 1992.
- BIBEL, M. & BARDE, Y. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous systems. *Genes & Dev.* 14: 2919-2937, 2000.
- BLEAKMAN, D. & LODGE, D. Neuropharmacology of AMPA and kainite receptors. *Neuropharm.* 37: 1187-1204, 1998.
- BONFOCO, E.; KRAINIC D.; ANKARCORONA, M; NICOTERA, P. & LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insult with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 7162-7166, 1995.
- BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A. & McCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348: 125-131, 1990.
- BURGOS, J. S.; BARAT, A.; SOUZA, D. O. & RAMÍREZ, G. Guanine nucleotides protect against kainate toxicity in an ex vivo chick retinal preparation. *FEBS Letters* 430: 176-180, 1998.
- CAMERON, H. A.; HAZLE, T. G. & McKAY, R. D. G. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurob.* 36: 287-306, 1998.
- CASTETS, F.; GRIFFIN, W. S.; MARKS, A. & VAN ELDIK, L. J. Transcriptional regulation of the human S100 beta gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 46: 208-216, 1997.
- CHEN, C. J; LIAO, S. L. & KUO, J. S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 75: 1557-1565, 2000.
- CHEN, T.A. YANG, F.; COLE, G.M. CHAN, S.O. Inhibition of caspase-3-like activity reduces glutamate induced cell death in the adult retina. *Brain Res.* 1: 1-12, 2001.
- CHOI, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7: 369-379, 1987.
- CHOI, D.W.; MAULUCCI-GEDDE, M. & KRIEGSTEIN, A. R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurochem.* 7: 357-368, 1987.
- CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634, 1988

- CLARKE, P. G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl.)* 181: 195-213, 1990.
- CLARKE, E. J. & ALLAN, V. Intermediate filaments: vimentin moves in. *Curr. Biol.* 12: 596-598, 2002.
- CICCARELLI, R.; IORIO, P.; GIULIANI, P.; D'ALIMONTE, I.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F. & RATHBONE, M. P. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25: 93-98, 1999.
- CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; D'ALMONTE, I.; GIULIANI, P.; FLORIO, T.; CACIAGLI, F.; MIDDLEMISS, P. J. & RATHBONE, M. P. Cultured astrocytes proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia*. 29: 202-211, 2000.
- CICCARELLI, R.; BALLERINI, P.; SBATINO, G.; RATHBONE, M. P.; D'ONOFRIO, M.; CACIAGLI, F. & DI IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19: 395-414, 2001.
- COLLINGRIDGE, G. L. & LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central neurons system. *Pharmacol. Rev.* 40: 144-209, 1989.
- COLLINS, E. & SIM, A.T. R. Regulation of neuronal PP1 and PP2 during development. *Methods. Mol. Biol.* 38: 21-43, 1998.
- CONTI, F. & WEINBER, R. J. Shaping excitation at glutamatergic synapses. *TINS* 22: 451-458, 1999.
- DAMSKY, C. H. & ILIC, D. Integrin signalling: it's where the action is. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 594-602, 2002.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. *Progr. Neurobiol.* 65: 1-105, 2001.
- DAVID, J. C.; YAMADA, K. A.; BAWGE, M. R. & GOLDBERG, M. P. AMPA receptor activation is rapidly toxic to cortical astrocytes when desensitization is blocked. *J. Neurosci.* 16: 200-209, 1996.
- DEV, K. H.; ROBERTS, P. J. & HENLEY, J. M. Characterisation of the interaction between guanyl nucleotides and AMPA receptors in rat brain. *Neuropharmacology* 35: 1583-1593, 1996.
- DIANO, S.; NAFTOLIN, F. & HORVATH, T. L. Kainate glutamate receptors (GluR5-7) in the rat arcuate nucleus: relationship to tanycytes, astrocytes, neurons and gonadal steroids receptors. *J. Neuroendocr.* 10: 239-247, 1998.



- DRINGEN, R. & HAMPRECHT, B. Glucose, insulin and insulin like growth factor I regulate the glycogen content in astroglial-rich primary cultures. *J. Neurochem.* 58: 511-517, 1992.
- DUVOISIN, R. M.; ZHANG, C. & RAMONELL, K. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J. Neurosci.* 15: 3075-3080, 1995.
- ENG, L. F. GFAP: the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 8: 203-214, 1985.
- ENG, L. F. & GHIRNIKAR, R. S. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4: 229-237, 1994.
- EXTON, J. H. Small GTPases minireview series. *J. Biol. Chem.* 273: 19923, 1998.
- FADEN, A. I.; DEMEDIUCK, P.; PANTER, S. S. & VINK, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244: 798-800, 1989.
- FARWELL, A. P. & DUBORD-TOMASETTI, S. A. Thyroid Hormone Regulates the Expression of Laminin in the Developing Rat Cerebellum. *Endocr.* 140: 4221-4227, 1999.
- FARWELL, A. P.; TRANTER, M. P. & LEONARD, J. L. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. *Endocr.* 136: 3909-3915, 1995.
- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42: 1-11, 1984.
- FRANDSEN, A. & SCHOUSBOE, A. Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. *J. Neurochem.* 60: 1202-1211, 1993.
- FRIZZO, M. E. S.; LARA D. R.; DAHM, K. C. S.; PROKOPIUK, A. S.; SWANSON R. & SOUZA, D. O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* 12: 1-3, 2001.
- FUKUDA, K.; KOJIRO, M.; CHIU, J.F.. Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: apoptosis or necrosis? *Am. J. Pathol.* 142: 936-946, 1993.
- GASIC, G. P. & HOLLMAN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 507-536, 1994.
- GARCIA-ABREU, J.; CAVALCANTE, L. A. & MOURA NETO, V. Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. *Neuroreport* 6: 761-764, 1995.
- GEGELASHVILI, G. & SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* 62: 6-15, 1997.

- GOMES, F. C. A.; MAIA, C. G.; MENEZES, J. R. L. & MOURA-NETO, V. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone induce neuronal proliferation. *Glia* 25: 247-255, 1999.
- GYSBERS, J. W. & RATHBONE, M. P. Guanosine enhances NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroreport*. 3: 997-1000, 1992.
- GYSBERS, J. W.; GUARNIERI, S.; MARIGGIÒ, M. A.; PIETRANGELO, T.; FANÒ, G. & RATHBONE, M. P. Extracellular guanosine 5' triphosphate enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth via increases in intracellular calcium. *Neuroscience* 96: 817-824, 2000.
- HATTEN, M. E. Neuronal inhibition of astroglial cell proliferation is membrane mediated. *J. Cell Biol.* 104: 1353-1360, 1987.
- HAYDON, P. G. Neurons and glia talk to each other. *Curr. Biol.* 10: 712-714, 2000.
- HIRAI, K.; SUGAWARA, T.; CHAN, P.K.; BASUS, V.J.; JAMES, T.L.; LITT, L. Cytochrome c associated apoptosis during ATP recovery after hypoxia in neonatal rat cerebrocortical slices. *J. Neurochem.* 83: 309-319, 2002.
- HIRASHIMA, Y.; KURIMOTO, M.; NOGAMI, K.; ENDO, S.; SAIOTH, M.; OHTANI, O.; NAGATA, T.; MURAGUCHI, A. & TAKAKU, A. Correlation of glutamate-induced apoptosis with acaspase activities in cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* 849: 109-118, 1999.
- HUTTERMANN, E.; UKENA D.; LESCHOW, V. & SCHWABE, U. Adenosine receptors in human platelets. Characterization by 5'-N-ethylcarboxamino- [ $H^3$ ]-adenosine binding in relation to adenylate cyclase activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* 325: 226-233, 2000.
- HUTTUNEN, H. J.; KUJA-PANULA, J.; SORCI, G.; AGNELETTI, A. L.; DONATA, R. & RAUVALA, H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S 100 $\beta$  proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* 275: 40096-40105, 2000.
- HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 4: 549-554, 1987.
- IORIO, P. D.; KLEYWEGT, S.; CICCARELLI, R.; TRAVESSA, U.; ANDREW, C. M.; CROCKER, C. E.; WERSTIUK, E. S. & RATHBONE, M. P. Mechanisms of apoptosis induced by purines nucleosides in astrocytes. *Glia* 38: 179-190, 2002.
- IRVING, E. A.; BARONE, F. C.; REITH, A. D., HADINGHAM, A. & PARSONS, A. A. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischemia in the rat. *Molec. Brain Res.* 77: 65-75, 2000.

- ISAACSON, J. S. & NICOLL, R. A. The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 70: 2187-2191, 1993.
- JANSSENS, N. & LESAGE, A. S. Glutamate receptor subunit expression in primary neuronal and secondary glial cultures. *J. Neurochem.* 77: 1457-1474, 2001.
- JACOBSSON, S. O. & FOWLER, C. J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephali cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. *Neurochem. Int.* 34: 49-62, 1999.
- KÁLMÁN, M. & AJTAI, B. M. A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin. *Int. J. Devl. Neurosci.* 19:101-108, 2001.
- KANE, C. J. M.; BROWN, G. J. & PHELAN, K. D. Transforming growth factor- $\beta$ 2 stimulates and inhibits neurogenesis of rat cerebellar granule cells in culture. *Dev. Brain Res.* 96: 46-51, 1996.
- KAPLAN, D. R. & MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 381-391, 2000.
- KERR, J. R. F.; WYLIE, A. H. & CURRIE, A. R.; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-257, 1972.
- KIM, J. K.; RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P. J.; HUGHES, D. W. & SMITH, R. W. Purinergic stimulation of astroblast proliferation: guanosine and its nucleotides stimulate cell division in chick astroblast. *J. Neurosci. Res.* 28: 442-455, 1991.
- KIMELBERG, H. K. & NOREMBERG, M. D. Astrocytes. *Scient. Amer.* 260: 44-52, 1989.
- KUCHENBAUER, F.; HOPFNER, U.; STALLA, J. A.; STALLA, G. K. & PAEZ-PEREDA, M. Extracellular matrix components regulate ACTH production and proliferation in corticotroph tumor cells. *Molec. Cell Endocr.* 175: 141-148, 2001.
- KUHN, T. B.; SCHMIDT, M. F. & KATER, S. B. Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones. ??? 14: 275-285, 1995.
- KUHN, H. G.; WINKLER, J. KEMPERMANN, G. THAL, L. J. & GAGE, F. H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 17: 5820-5829, 1997.
- LARA, D. R.; SCHMIDT, A. P.; FRIZZO, M. E. S.; BURGOS, J. S.; RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.* 912: 176-180, 2001.

- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685, 1970.
- LEFRANÇOIS, T.; FAGES, C.; PESCHANSKI, M. & TARDY, M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *J. Neurosci.* 17: 4121-4128, 1997.
- LETOURNEAU, P. C.; PECH, I. V.; ROGERS, S. L.; PALMS, S. L.; MCCARTHY, J. B. & FURCHT, L. T. growth cone migration across extracellular matrix components depends on integrin but migration across glioma cells does not. *J. Neurosci.* 21: 286-297, 1988.
- LETOURNEAU P. C.; CONDIC, M. L. & SNOW, D. M. Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J. Neurosci.* 14: 915-928, 1994.
- LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor: Its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect.* 60: 217-259, 1966.
- LEVITT, S. P. & RAKIC, P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 193: 815-840, 1980.
- LI, Y.; WANG, J.; SHENG, J. G.; LIU, L.; BARGER, S. W.; JONES, R. A.; VAN ELDIK, L. J.; MRAK, R. E. & GRIFFIN, W. S. T. S100 $\beta$  increases levels of  $\beta$ -amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J. Neurochem.* 71: 1421-1428, 1998.
- LIEDTKE, W.; EDELMANN, W.; BIERI, P. L.; CHIU, F. C.; COWAN, N. J. KUCHERLAPATI, R. & RAINE, C. S. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17: 607-615, 1996.
- LIESI, P.; HAGER, G.; DODT, H. U.; SEPPALA, I. & ZIEGLGANSBERGER, W. Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 40: 199-206, 1995.
- LIPTON, S. A. & ROSEMBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 30: 613-622, 1994.
- LLANSOLA, M.; MONFORT, P. & FELIPO, V. Inhibitors of phospholipase C prevent glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *J. Pharmac. Exp. Therap.* 292: 870-876, 2000.
- LUCAS, D. R. & NEWHOUSE, J. P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201, 1957.
- LUCKENBILL-EDDS, L. Laminin and the mechanism of neuronal growth. *Brain Res. Rev.* 23: 1-27, 1997.

- MALCON, C.; ACHAVAL, M.; KOMLUS, S.; PARTATA, W.; SAURESSIG, M.; RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH diaphorase-positive cells in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 225: 145-148, 1997.
- MARTINEZ, R. & GOMES, F. C. A. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 277: 49311-49318, 2002.
- MASSIEU, L. & TAPIA, R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats *in vivo*. *J. Neurochem.* 69: 1151-1160, 1997.
- MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 120-129, 2000.
- MATUTE, C.; SÁNCHEZ-GOMEZ, M. V.; MARTÍNEZ-MILLÁN, L. & MILEDI, R. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 8830-8835, 1997.
- MATUTE, C.; ALBERDI, E.; IBARRETXE, G. & SÁNCHEZ-GÓMEZ, MV. Excitotoxicity in glial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 447: 239-246, 2002.
- MEAROW, K. M.; MILL, J. F. & FREESE, E. Neuron-glia interactions involved in the regulation of glutamate synthetase. *Glia* 3: 385,392, 1990.
- MENET, V.; RIBOTA, M. G.; CHAUVET, N.; CRIAN, M. J.; LANNOY, J.; COLUCCI-GUYON, E. & PRIVAT, A. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J. Neurosci.* 16: 6147-6158, 2001.
- MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54: 369-415, 1998.
- MOLZ, S.; OLIVEIRA, I. J. L.; SOUZA, D. O. & TASCA C. I. GMP prevents toxicity in hippocampal slices submitted to glutamate in a chemical model of ischemia. *J. Neurochem.* 79: 196, Abstract BP23-33, 2001.
- MONAHAN, J. B.; HOOD, W. F.; MICHEL, J. & COMPTON, R. P. Effects of guanine nucleotides on N-methyl-D-aspartate receptor-ligand interactions. *Mol. Pharmacol.* 34: 111-116, 1988.
- MORITA, N.; NAKAHIRA, K.; BABA, H.; AKITA, H.; KUMADA, T.; OGAWA, M.; NAKAJIMA, K.; KAWATA, M.; MIKOSHIBA, K. & IKENAKA, K. Astrocytic lineage analysis by detection of GFAP promoter activity in vitro. *Develop. Neurosci.* 19:210-218, 1997.

- MORRIS, A. J. & MALBON, C. G. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.* 79: 1373-1430, 1999.
- NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256: 12-18, 2000.
- NAGEL, M. & WINKLBAUER, R. Establishment of substratum polarity in the blastocoel root of *Xenopus* embryo. *Dev.* 126: 1975-1984, 1999.
- NAITO, S. & UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44: 99-109, 1985.
- NEDERGAARD, M.; TAKAHIRO, T. & HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Rev. Neurosc.* 3: 748-755, 2002.
- NEGRI, C.; DONZELLI, M.; BERNARDI, R.; ROSSI, L.; BURKLE, A. & SCOVASSI, A. I. Multiparametric staining to identify apoptotic human cells. *Exp. Cell Res.* 234: 174-177, 1997.
- OLIET, S. H.; PIET, R. & POULAIN, D. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292: 923-926, 2001.
- OLIVEIRA, I. J. L.; MOLZ, S.; SOUZA, D. O. & TASCA, C. I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an *in vitro* model of ischemia. *Cel. Molec. Neurobiol.* 22: 335-344, 2002.
- OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 164: 719-721, 1969.
- PAAS, Y.; DEVILLERS-THIERY, A.; CHANGEUX, J.-P.; MEDEVIELLE, F. & TEICHBERG, V.I. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. *EMBO J.* 15: 1548-1556, 1996.
- PALU, E. & LIESI, P. Differential distribution of laminins on Alzheimer disease and normal human brain tissue. *J. Neurosc. Res.* 69: 243-256, 2002.
- PARKINSON, F. E.; SINCLAIR, C. J. D.; OTHMAN, T.; HAUGHEY, N. J. & GEIGER, J. D. Differences between rat primary cortical neurons and astrocytes in purine release evoked by ischemic conditions. *Neuropharm.* 43: 836-846, 2002.
- PARNAVELAS, J. G.; LUDER, R.; POLLARD, S. G.; SULLIVAN, K. & LIBERMAM, A. R. A qualitative and quantitative ultrastructural study of glial cells in the developing visual cortex of the rat. *Philos. Trsans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 301: 55-84, 1983.
- PAZ, M. M.; RAMOS, M.; RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. *FEBS Lett.* 355: 205-208, 1994.

- PEKONY, M.; STANESS, K.; ELIASSON, C.; BETSHOLTZ, C. & JANIGRO, D. Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia* 22: 390-400, 1998.
- PERZEL'OVA, A.; MARES, V. (1993). Appearance of GFAP-positive cells in adult human brain cultures spontaneously decelerated in growth. *Glia*. 7:237-244.
- PESHEVA, P. & PROBSTMEIER, R. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog. Neurobiol.* 61: 465-493, 2000.
- PFRIEGER F. W. & BARRES, B. A. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277: 1684-1687, 1997.
- PIN, J. P. & DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptor: structure and functions. *Neuropharm.* 34: 1-26, 1995.
- PORCIÚNCULA, L. O.; VINADÉ, L.; WOFCHUK, S. & SOUZA, D. O. Guanine based purines inhibit [<sup>3</sup>H]glutamate and [<sup>3</sup>H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 928: 106-112, 2002.
- PRIETO, M. & ALONSO, F. Differential sensitivity of cultured tanocytes and astrocytes to hydrogen peroxide toxicity. *Exp. Neurol.* 155: 118-127, 1999.
- PRIVAT, A. Astrocytes as support for axonal regeneration in the Central Nervous System of mammals. *Glia* 43: 91-93, 2003
- PRYBYLOWSKI, K. & WENTHOLD, R. J. NMDA receptors: Subunit assembly and trafficking to the synapse. *J. Biol. Chem.*, 2004 (no prelo).
- RAFF, M. C.; MILLER, R. H. & NOBLE, M. A glia progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390-396, 1983.
- RAKIC, P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. *J. Comp. Neurol.* 141: 283-312, 1971.
- RAKIC, P. Elusive Radial Glial Cells: Historical and Evolutionary Perspective. *Glia*: 43: 19-32, 2003.
- RATHBONE, M. P. & JUURLINK, B. Hippocampal neurons in vitro respond to extracellular guanosine and GTP with neurite outgrowth and branching. *Abstr. Soc. Neurosc.* 19: 88, (424.7), 1993.

- RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P. J.; GYSBERS, W. J.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A. R.; REED J. K.; CICCARELLI, R.; IORIO, P. D. & CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 39: 663-690, 1999.
- REGNER, A.; CRESTANA, R. E.; SILVEIRA-FILHO, J. P. J.; FRIEDAMN, G.; CHEMALE, I. & SOUZA, D. O. Guanine nucleotides are present in human CSF. *NeuroReport* 8: 3771-3774, 1997.
- REGNER, A.; RAMÍREZ, G.; BELLÓ-KLEIN, A. & SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on glutamate-induced chemiluminescence in rat hippocampal slices submitted to hypoxia. *Neurochem. Res.* 23: 523-528, 1998.
- REICHARDT, L. F. & TOMASELLI, K. J. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosc.* 14: 531-570, 1991.
- ROBINSON, M. B. & DOWD, L. A. Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv. Pharmacol.* 37: 69-115, 1997.
- ROTHERMUNDT, M.; PETERS, M.; PREHN, H. M. & AROLT, V. S100 $\beta$  in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60: 614-632, 2003.
- ROTHSTEIN, J. D.; DYKES-HOBERG, M.; PARDO, C. A.; BRISTOL, L. A.; JIN, L.; KLUNCL, R. W.; KANAI, Y.; HEDIGER, M. A.; WANG, Y.; SCHIELKE, J. P. & WELTY, D. F. Knock out of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686, 1996.
- ROWITCH, D. H; LU, Q. R.; KESSARIS, N. & RICHARDSON, W.D. An “oligarchy” rules neural development. *TINS* 25: 417-422, 2002.
- RUBIN, M. A.; JURACH, A.; DA COSTA-JÚNIOR, E. M.; LIMA, T. T. F.; JIMÉNEZ-BERNAL, R. E.; BEGNINI, J.; SOUZA, D. O. & DE MELLO, C. F. GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats. *NeuroReport* 7: 2078-2080, 1996.
- RUBIN, M. A.; JURACH, A.; ZANOLLA, G. R.; BOENO, R.; SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *NeuroReport* 8: 3713-2316, 1997.
- SANDBERG, M., BUTCHER, S. P. & HAGBERG, M. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hyoglycemia: *in vivo* dialysis of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 47: 178-184, 1986.
- SASTRY, P.S. & RAO, K.S. Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74: 1-20, 2000.



- SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; MARASCHIN, J. F.; PERLA, A. S. & SOUZA, D. O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864: 40-43, 2000.
- SCHWARTZ, M. A. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* 11: 466-470, 2001.
- SCHWARZBAUER, J. E. & SECHLER, J. L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 622-627, 1999.
- SECHLER, J. L. & SCHWARZBAUER, J. E. Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *J. Biol. Chem.* 40: 25533-25536, 1998.
- SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; ARCO, D. A. & MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Develop.* 122: 1-29, 2001.
- SEIFERT, G.; REHN, L.; WEBER, M. & STEINHAUSER, C. AMPA receptor subunits expressed by single astrocyte in the juvenile mouse hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 47: 286-294, 1997.
- SERINI, G.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; ROPRAZ, P.; GEINOZ, A.; BORSI, L.; ZARDI, L. & GABBIANI, G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- $\beta$ 1. *J. Cell Biol.* 142: 873-881, 1998.
- SKEHAN, P. Cytotoxicity and cell growth assays. In: *Cell Biology: A laboratory handbook*. Ed. Julio E. Celis. 2ed. v.1, p.313, 1998.
- SOUZA, D. O. & RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J. Mol. Neurosci.* 3: 39-45, 1991.
- STAIMIROVIC, D. B.; BALL, R.; SMALL, D. L. & MURUGANANDAM, A. Developmental regulation of glutamate transporters and glutamine synthetase activity in astrocytes cultures differentiated *in vitro*. *Int. J. Devl. Neurosc.* 17: 173-184, 1999.
- STEWART, G. R. & PEARLMAN, A. L. Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 7: 3325-3333, 1987.
- STREULI, C. Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 634-640, 1999.
- TASCA, C. I.; WOFCHUK, S. T.; SOUZA, D. O.; RAMÍREZ, G. & RODNIGHT, R. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *Neuroreport* 6: 249-252, 1995.
- TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; MARTINI, L. H.; RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptors activation. *Neurochem. Res.* 23: 183-188, 1998.

- TASCA, C. I.; BURGOS, J. S.; BARAT, A.; SOUZA, D. O. & RAMÍREZ, G. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. *Neuroreport* 10: 1981-1983, 1999a.
- TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; MARTINI, L. H. & SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on adenosine and glutamate modulation of cAMP levels in optic tectum slices from chicks. *Neurochem. Int.* 34: 213-220, 1999b.
- TASCA, C. I. & SOUZA, D. O. Interaction of adenosine and guanine derivatives in the rat hippocampus: effects on cAMP levels and on the binding of adenosine analogues and GMP. *Neurochem. Res.* 25: 181-188, 2000.
- THANGNIPON, W.; KINGSBURY, A.; WEBB, M. & BALÁZ, R. Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Dev. Brain Res.* 11: 177-189, 1983.
- THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593-598, 1995.
- THOMAS, C.E. & MAYLE, D.A. NMDA-sensitive neurons profoundly influence delayed staurosporine-induced apoptosis in rat mixed cortical neuronal cultures. *Brain Res.* 889: 163-173, 2000.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1326, 1998.
- TRAVERSA U.; BOMBU, G.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; WERSTIUK, E. S. & RATHBONE, M.P. Specific [<sup>3</sup>H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *Br. J. Pharmacol.* 135: 969-976, 2002.
- TRENTIN, A. G. & MOURA NETO, V. T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *NeuroReport*. 6: 293-296, 1995.
- TRENTIN, A. G.; ROSENTHAL, D. & MOURA NETO, V. Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation and proliferation. *J. Neurosc. Res.* 41: 409-417, 1995.
- TRENTIN, A.G.; MENDES DE AGUIAR, C. B. N.; GARCEZ, R. C. & ALVAREZ-SILVA, M. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte - effects on astrocyte adhesion. *Glia* 42: 359-369, 2003.
- UEDA, S.; KOKOTOS LEONARDI, E. T.; BELL III, J. & AZMITIA, E. C. Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S100 $\beta$  antisense gene. *Mol. Brain Res.* 29: 365-368, 1995.
- VAN ELAIK, L. J.; CHRISTIE-POPE, B.; BOLIN, L. M.; SHOOTER, E. M. & WHETSEEL Jr, W. O. Neurotrophic activity of S100 $\beta$  in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res.* 542: 280-285, 1991.

- VENSTRON, K. A. & REICHARDT, L. F. Extracellular matrix 2: role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 7: 996-1003, 1993.
- VERKHRATSKY, A. & STEINHAUSER, C. Ion channels in glial cells. *Brain Res. Rev.* 32: 380-412, 2000.
- VICÁRIO-ABEJÓN, C.; OWENS, D.; McKAY, R. & SEGAL, M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nature Rev. Neurosc.* 3: 965-974, 2002.
- WALKER, A., GALLAGHER, J.T. Structural domains of heparan sulfate for specific recognition of the c-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin (HEPII). *Biochem. J.* 317:871-877, 1996.
- WEINSTEIN, D. E.; SHELANSKI, M. L. & LIEM, R. K. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J. Cell Biol.* 112: 1205-1213, 1991.
- WHITAKER, J. F. Lactate dehydrogenase as a cytoplasmatic marker in brain. *Clin. Chim. Acta* 24: 23-27, 1969.
- WHITAKER-AZMITIA, P. M.; MURPHY, R. & AZMITIA, E. C. Stimulation of astroglial 5-HT<sub>1A</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S100, and alters astroglial morphology. *Brain Res.* 528: 155-159, 1990.
- WINNIGHAM-MAJOR, F.; STAECKER, J. L.; BARGER, S. W.; COATS, S. & VAN ELDIK, L. J. Neurite expansion and neuronal survival activities of recombinant S100 $\beta$  proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J. Cell Biol.* 109: 3063-3071, 1989.
- WU, C.; KEIGHTLEY, S. Y.; LEUNG-HAGESTEIJN, C.; RADEVA, G.; COPPOLINO, M.; GOICOECHEA, S.; McDONALD, J. A. & DEDHAR, S. Integrin-liked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* 273: 526-536, 1998.
- YONEDA, J.; SAIKI, I.; IGARASHI, Y.; KOBAYASHI, H.; FUGII, H.; ISHIZAKI, Y.; KIMIZUKA, F.; KATO, I. & AZUMA, I. Role of the heparin-binding domain of chimeric peptides derived from fibronectin in cell spreading and motility. *Exp. Cell. Res.* 217:169-179, 1995.
- ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron.* 32:427-438, 2001.
- ZHANG, Y. & HERMANN, B. Aging and apoptosis. *Mechan. Ageing Dev.* 123: 245-260, 2002.
- ZIMMERMANN, H. & BRAUN, N. Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous tissue. *J. Auton. Pharmacol.* 16, 397– 400, 1996.